

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Белогуров Алексей Анатольевич

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ АУТОИММУННОЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

Специальность 02.00.10 – Биоорганическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва – 2018

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

Официальные оппоненты:

академик РАН, д.б.н. Угрюмов Михаил Вениаминович, заведующий лабораторией нервных и нейроэндокринных регуляций Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук (ИБР РАН);

чл.-корр. РАН, д.х.н. Лаврик Ольга Ивановна, заведующая лабораторией биоорганической химии ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН);

чл.-корр. РАН, д.х.н., Кочетков Сергей Николаевич, заведующий лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

Ведущая организация:

Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Защита состоится «20» июня 2018 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д.002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

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

Автореферат разослан ____ 2018 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор физико-математических наук

Олейников В. А.



I. ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

На сегодняшний день известны почти 100 заболеваний человека, имеющих аутоиммунную этиологию, и ожидается, что в ближайшие десятилетия этот список станет еще более представительным. Аутоиммунные нарушения являются одной из самых страшных глобальных угроз для здоровья человечества в XXI веке, и в скором времени по значимости могут обойти проблему злокачественной трансформации. Одним из наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний нейродегенеративной природы является рассеянный склероз (РС). По приблизительным оценкам от 2 до 2.5 миллионов человек во всем мире (с частотой в среднем 30 больных на 100 000 человек населения) страдают этим недугом. Пациентов с рассеянным склерозом в нашей стране насчитывается более 200 000 человек. Средний возраст проявления первых клинических признаков РС колеблется от 20 до 40 лет, что придает этому заболеванию чрезвычайно острое социально-экономическое значение, так как по прошествии 10-15 лет инвалидизации подвергаются лица на пике физического и творческого развития.

Терапия аутоиммунных заболеваний, в частности РС, несмотря на успехи, достигнутые в последние годы с помощью рекомбинантных антител и других полипептидных и малых молекул, специфически действующих на компоненты иммунной системы, не позволяет добиться полного выздоровления пациента. Существующие на сегодняшний момент методики лечения РС включают в себя в основном иммуносупрессирующие препараты ненаправленного действия, приводящие в большом количестве случаев к системным осложнениям. В связи с этим очевидно, что отечественная медицина крайне заинтересована, первое – в усилении существующих подходов или замене их на более совершенные, второе – в реализации этих проектов непосредственно на территории Российской Федерации. Резюмируя, можно с уверенностью сказать, что успешное осуществление двух этих задач приобретает приоритет национального значения.

Для разработки лекарств направленного действия необходимо глубокое понимание молекулярно-биологических и биохимических основ процессов, лежащих в основе иммунного ответа на собственные антигены. Патогенез РС заключается в нарушении целостности миелиновой оболочки нервных волокон, формируемой специализированными клетками – олигодендроцитами. Первопричиной этого является активация миелин-реактивных лимфоцитов, проникающих за гематоэнцефалический барьер (ГЭБ),

что приводит на начальном этапе к демиелинизации, далее к аксональному/нейрональному повреждению и в конечном итоге – гибели олигодендроцитов. Этот процесс клинически проявляется в постепенном снижении способности аксонов проводить нервный импульс. Исторически основную роль в развитии РС отводили Т-лимфоцитам, в то время как исследования последних двух десятилетий выявили особую значимость аутореактивных В-клеток в патогенезе данного заболевания. Однако, последовательности соответствующих им В-клеточных рецепторов (БКР) изучены явно в недостаточной степени, при этом для подавляющего большинства из них не установлена даже антигенная специфичность. В связи с вышеизложенным, выявление и анализ последовательности таких БКР может прояснить этиологию РС, в то время как взаимно-однозначное соответствие «структура-функция» может способствовать появлению более совершенных методов диагностики и направленной терапии РС. Чрезвычайно актуальной задачей видится детализация вирусных антигенов, способных индуцировать образование В-клеток, реактивных к компонентам миелиновой оболочки. Наконец, в последнее время становится все более очевидным, что направленная элиминация подобных аутореактивных клеток может быть предпринята только после детального выяснения уникальных поверхностных детерминант, которые им присущи. Не менее важным вопросом является презентация миелиновых антигенов в процессе возникновения адаптивного аутоиммунитета. Для реализации своего цитотоксического потенциала Т-клетки должны опознать фрагменты миелина на поверхности олигодендроцитов. В деградации внутриклеточных белков для их последующей презентации особое значение имеет многосубъединичный мультикаталитический белковый комплекс, называемый протеасомой. На сегодняшний день явным образом выявлена связь молекулярных механизмов деградации и последующей презентации миелиновых аутоантигенов с развитием РС.

Цель работы и основные задачи исследования

Целью работы является изучение фундаментальных основ аутоиммунной нейродегенерации, а также разработка подходов к терапии этого заболевания. Для достижения заявленной цели были поставлены и решены следующие экспериментальные задачи:

1. Изучение репертуара аутореактивных иммуноглобулинов к миелиновым антигенам.
2. Экспериментальное подтверждение гипотезы молекулярной мимикрии как одного из вариантов развития РС.

3. Установление связи убиквитин-независимой внутриклеточной деградации физиологически значимого аутоантигена протеасомой с развитием аутоиммунной нейродегенерации.
4. Создание модульных бифункциональных иммунотоксинов, позволяющих проводить узконаправленную элиминацию заранее predetermined популяций патологических лимфоцитов.
5. Разработка подходов к индукции толерантности инкапсулированными фрагментами аутоантигенов, а также использование ингибиторов каталитических субъединиц иммунопротеасомы в качестве средства для терапии аутоиммунной нейродегенерации.

Научная новизна и практическая значимость работы

В ходе выполнения диссертационной работы было показано, что основной заряд в купе с развернутой конформацией способствует гидролизу белков протеасомой убиквитин-независимо, таким образом, был открыт новый класс протеасомных дегронов. Несмотря на известные ранее факты гидролиза белков протеасомой без участия убиквитина, впервые показан факт разрушения протеасомой физиологически значимого аутоантигена подобным образом. При протекании экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита продемонстрировано увеличение количества иммунопротеасом в центральной нервной системе, при этом впервые удалось показать стерическую разобщенность каталитических субъединиц протеасомы, экспериментально подтвердив присутствие каталитической иммуносубъединицы протеасомы $\beta 1i$ в олигодендроцитах, а $\beta 5i$ – в лимфоцитах, инфильтрирующих через гематоэнцефалический барьер. Продемонстрировано ранее неизвестное свойство $\beta 1i$ -специфического пептидилэпоксикетона снижать тяжесть протекания экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита. В настоящей работе создана панель модульных иммунотоксинов и экспериментально подтверждена возможность селективно подавлять популяцию миелин-реактивных В-клеток *in vivo*. С использованием эпитопной библиотеки основного белка миелина (МВР) осуществлено профилирование аутореактивного В-клеточного ответа при рассеянном склерозе и экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите. Это позволило на первом этапе выбрать релевантную животную модель РС и далее успешно осуществить индукцию толерантности иммунной системы к миелиновым аутоантигенам путем введения иммунодоминантных фрагментов МВР в составе маннозилирован-

ных липосом. При анализе репертуаров аутореактивных иммуноглобулинов, ассоциированных с рассеянным склерозом, с использованием фаг-дисплейных библиотек впервые получены экспериментальные данные, которые напрямую свидетельствуют о взаимосвязи вируса Эпштейн-Барр (EBV) и патогенеза рассеянного склероза.

Полученные в данной работе фундаментальные результаты были с успехом использованы для создания первого в отечественной истории оригинального препарата для лечения рассеянного склероза. Успешно завершена вторая фаза клинических испытаний, проведенная на 20 пациентах с РС. Накопленные клинические данные свидетельствуют о полной безопасности препарата, а также о значимой стабилизации принимавших препарат пациентов, у которых ранее наблюдался прогрессирующий РС. Обобщение полученных экспериментальных данных и подходов дает основание сформулировать идею создания молекулярно-биологической платформы, с одной стороны объединяющей в себе определение лигандов В-клеточных рецепторов аутореактивных лимфоцитов с использованием комбинации рациональных и комбинаторных эпитопных библиотек, а также методов высокопроизводительного скрининга, и с другой стороны – с дальнейшим созданием на их основе иммунотоксинов для селективной элиминации аутореактивных В-клеток. На настоящий момент очевидно, что внедрение подобной платформы в клиническую практику может стать эффективным средством в борьбе с аутоиммунными нарушениями.

Публикация и апробация работы

Основные научные результаты диссертации опубликованы в 31 работе в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых Минобрнауки РФ для опубликования результатов диссертаций, из них – 3 обзора, имеется монография и четыре патента. Работа доложена на целом ряде российских и международных научных конференций, включая симпозиальные доклады на конгрессе FEBS и других съездах.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 230 страницах и содержит 87 рисунков и 13 таблиц.

II. СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Изучение репертуара аутореактивных иммуноглобулинов к миелиновым аутоантигенам

Для решения одной из центральных задач данной диссертации, а именно выявления триггерных механизмов индукции РС, необходимо было разработать подходы для исследования структурных особенностей репертуаров аутоантител при данной патологии. В силу аномально большого положительного заряда МВР методически достаточно трудно исследовать его взаимодействие с аутоантителами. В этой связи в настоящем исследовании мы использовали ранее созданную библиотеку эпитопов МВР, чтобы выявить и сравнить характер связывания аутоантител, содержащихся в образцах сыворотки крови пациентов с ремитирующим типом течения РС и грызунов с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (ЕАЕ). Результаты этого исследования обобщены на рисунке 1. Как и в наших предыдущих исследованиях, аутоантитела из сыворотки крови пациентов с РС связывали фрагменты МВР 42-65, 84-100 и 115-170. При анализе сыворотки крови трех линий грызунов, развивающих ЕАЕ, мы выявили наличие аутоантител к одной иммунодоминантной области (МВР₁₂₄₋₁₄₇) у мышей C57/BL6, к двум областям (МВР₂₄₋₄₄ и МВР₇₂₋₁₃₉) у мышей линии SJL/J, и также две области (МВР₄₀₋₆₀ и МВР₁₀₇₋₁₇₀) у крыс линии DA. Исходя из профиля связывания аутоантител, очевидно, что DA крысы с индуцированным ЕАЕ являются наиболее релевантной моделью РС.

С использованием фаг-дисплейной библиотеки переменных фрагментов антител (scFv), созданной на основе В-клеток из пациентов с РС, нами было отобрано 13 моноклональных антител, связывающих МВР. Сравнение аминокислотных последовательностей, соответствующих найденным переменным фрагментам, с другими известными антителами с использованием ресурса Protein BLAST выявило высокую гомологию (до 95%) между отобранными scFv и переменными областями антител, специфичных к латентному мембранному белку 1 (LMP1) вируса EBV и аутоантител, ранее обнаруженных в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) пациентов с РС (**Рис. 2**). Десять тяжелых и семь легких цепей из 13 scFv были гомологичны с таковыми у антител, связывающих LMP1. Обе цепи клона D12 имели сходную зародышевую линию с антителом F5, связывающим LMP1. Клоны NT5.1, NT12 и B5 состояли из комбинаций тя-

желых и легких цепей, соответствующих различным анти-LMP1 антителам. Интересно, что клон NT56 состоял из комбинации тяжелой цепи, соответствующей анти-LMP1 антителу, и легкой цепи антитела из ЦСЖ пациента с РС.

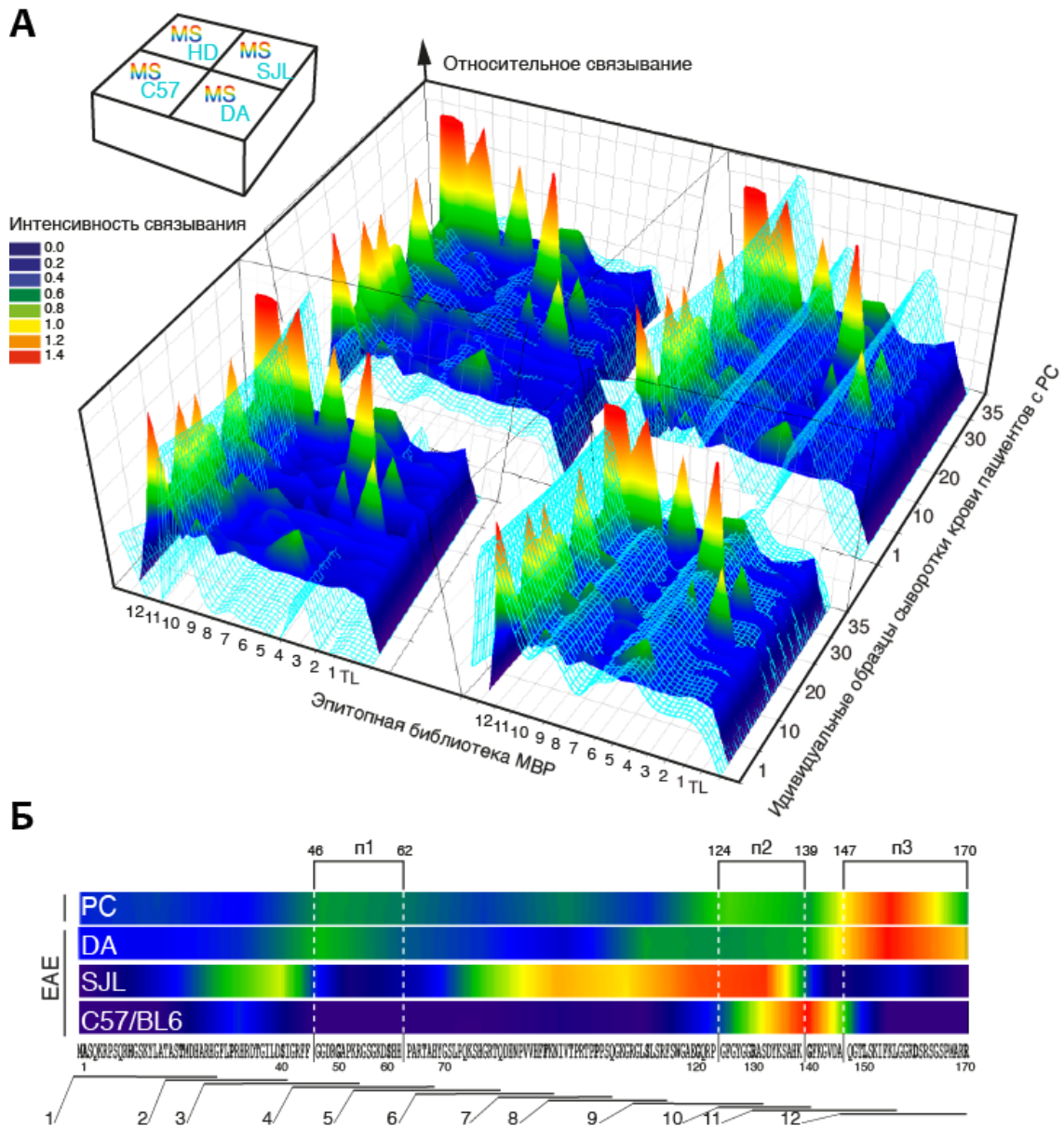


Рис. 1 Паттерны связывания сывороточных аутоантител, изолированных из пациентов с РС. Интенсивность связывания обозначена цветовым градиентом. На панели (А) присутствует наложение паттерна связывания аутоантител из сыворотки крови животных с индуцированным ЕАЕ (голубая поверхность). На панели (Б) показано интегральное значение связывания аутоантител из различных источников в размерности аминокислотной последовательности МВР. Указаны пептиды, составляющие эпитопную библиотеку МВР.

Клон F11, в свою очередь, содержал тяжелую и легкую цепи, соответствующие антителу из ЦСЖ пациента с РС и LMP1-специфичному антителу. Одной из наиболее интересных комбинаций был клон E2, который был гомологичен как антителу MS2 из

пациента с РС, так и антителу A4, связывающему LMP1. В целом эти наблюдения свидетельствуют о том, что нам удалось отобрать из фаг-дисплейной библиотеки ряд антител, очень близких по своей структуре природным.

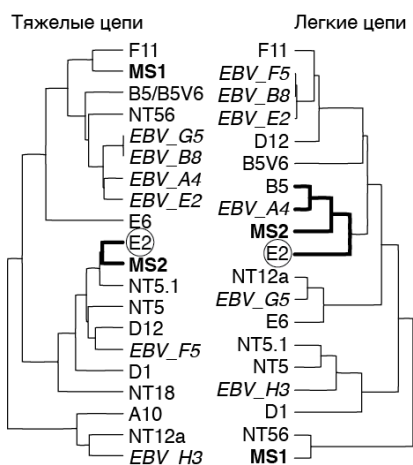


Рис. 2 Филогенетическое древо переменных фрагментов отобранных scFv, а также их гомология с антителами к белку LMP1 EBV (показаны курсивом) и последовательностями антител, выявленных по результатам секвенирования одиночных В-клеток из ЦСЖ пациентов с РС (обозначенных жирным шрифтом).

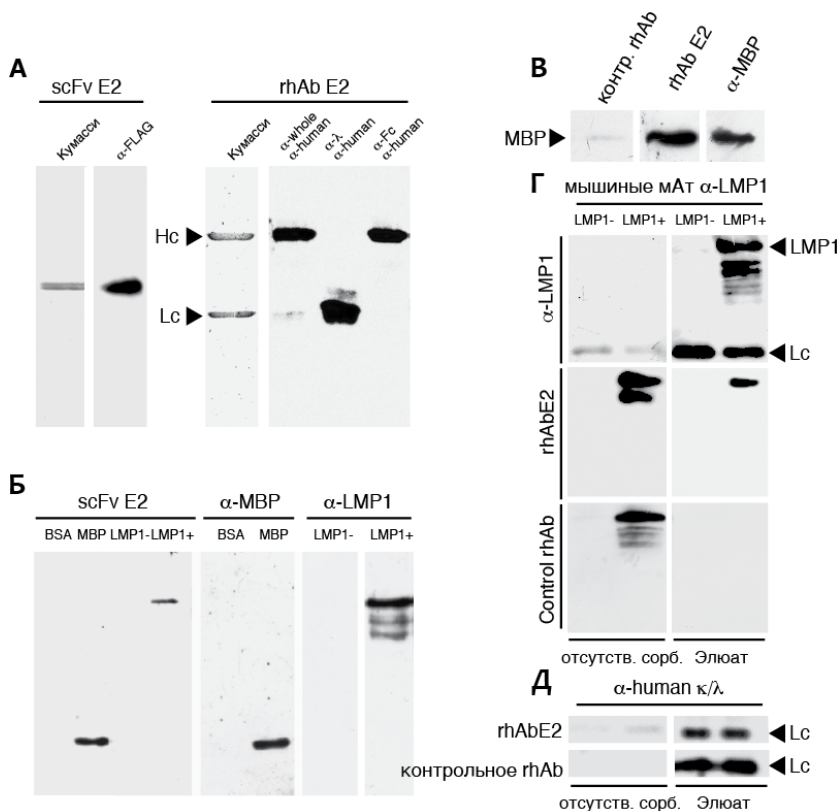


Рис. 3 (А) Очищенный растворимый scFv E2 (левая панель) и полноразмерное человеческое антитело, несущее его переменные фрагменты (rhAb E2, правая панель), подвергали разделению в ПААГ и далее окрашивали Кумасси или анализировали Вестерн-блоттингом. (Б) Вестерн-блоттинг анализ связывания scFv E2 с белками MBP и LMP1. (В, Г). Рекомбинантное человеческое антитело rhAbE2 связывает MBP на вестерн-блоттинге (В) и иммунопреципитирует LMP1 из раствора (Г). Рекомбинантное человеческое антитело rhAbE2 и контрольное человеческое рекомбинантное антитело, полученное в той же системе экспрессии (Control rhAb), а также анти-LMP1 антитело мыши инкубировали с клеточными лизатами клеток линии НЕК293, трансфицированными и нетрансфицированными LMP1 с последующим осаждением PrA-агарозой. Далее фракции разделяли в ПААГ и анализировали Вестерн-блоттингом. (Д) Контрольное прокрашивание антивидовыми антителами.

Далее нами был осуществлен анализ связывания растворимого scFv E2 (**Рис. 3А**, левая панель) с белками MBP и LMP1 методом Вестерн-блоттинга. Для этой цели мы использовали эукариотическую клеточную линию НЕК293, экспрессирующую рекомбинантный LMP1, и нетрансфицированные клетки в качестве отрицательного контроля. Мы

показали, что scFv E2 взаимодействует как с LMP1, так и с МВР (Рис. 3Б). Чтобы убедиться, что такая комбинация легкой и тяжелой цепей может существовать и быть функциональной по своей природе, мы интегрировали вариабельные области клона E2 в полноразмерное антитело человека (Рис. 3А, правая панель). Полученное антитело rhAb E2 также взаимодействовало с МВР на Вестерн-блоттинге (Рис. 3В) и преципитировало LMP1 из раствора (Рис. 3Г и 3Д).

В рамках развития понимания физиологической значимости найденных вариабельных последовательностей миелин-реактивных антител нами был проведен анализ комбинаций VH и VL этих антител в терминах их аффинности к МВР и перекрестной реактивности против панели потенциальных аутоантигенов. С этой целью мы интегрировали вариабельные области клонов A10, B5, B5V6, E2 и F11 в соответствующие плазмидные векторы, кодирующие последовательность полноразмерных цепей иммуноглобулина человека, а затем провели трансфекцию клеток CHO всеми возможными комбинациями VH-VL.

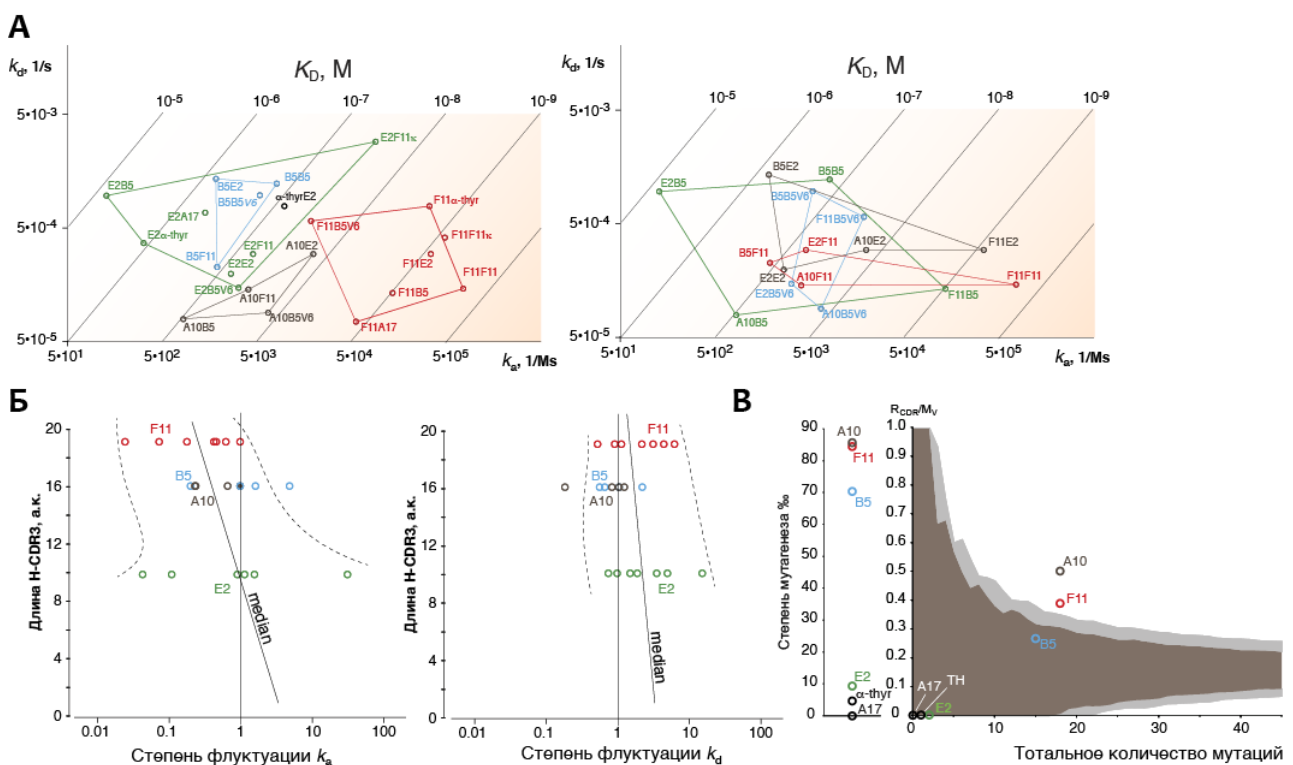


Рис. 4 (А) Изменение аффинности к МВР при варьировании тяжелых и лёгких цепей согласно результатам ППР. (Б) Степень флуктуации k_a и k_d в зависимости от длины HCDR3. (В) Частота соматических мутаций на 1000 п.о. (левый рисунок) и анализ антиген-направленного созревания антител (правый рисунок). Отношение мутаций в H-CDR1 и H-CDR2 (RCDR) к общему числу мутаций в вариабельном регионе (MV) относительно MV. Серая и коричневая области соответствуют 95% и 90% вероятности случайной мутации. Расположение точки над верхней границей доверительного интервала является признаком антиген-направленного созревания.

Метод поверхностного плазмонного резонанса (ППР) позволил наиболее детально описать сродство иммуноглобулинов к МВР (**Рис. 4**). Анализ констант динамической ассоциации и диссоциации (k_a и k_d) привел к двум основным выводам: во-первых, кластеры, образованные иммуноглобулинами с одним и тем же VH, но с разными VL доменами (**Рис. 4А**), характеризуются более низким рассеянием значений k_a и k_d по сравнению с кластерами иммуноглобулинов с одинаковым VL, но с разными VH доменами (**Рис. 4Б**); во-вторых, значения k_a в обоих случаях колеблются в более широком диапазоне, чем значения k_d . Таким образом, кластеры антител с разными легкими цепями, в отличие от антител с разными тяжелыми цепями, не перекрываются и в основном распределены вдоль, а не перпендикулярно изобарам K_D , что свидетельствует об устойчивости их результирующей аффинности. Это явление может быть частично объяснено компенсацией частного k_a/k_d в том случае, когда структура антитела обеспечивает более эффективное динамическое связывание и, одновременно, более легкое высвобождение лиганда. Интересно, что диапазон флуктуаций k_a градиентно уменьшался с увеличением длины третьего гипервариабельного участка, определяющего комплементарность (H-CDR3), а также степени зрелости антител (**Рис. 4В**).

Для более детального анализа репертуаров иммуноглобулинов к миелиновым и вирусным антигенам нами был проведен фаговый отбор библиотеки scFv на антигены МВР, LMP1, MOG и последовательно на LMP1-МВР (**Рис. 5А**). Основные количественные характеристики обнаруженных последовательностей зародышевых линий (гермлайнов) IgHV, IgKV и IGLV приведены на рисунке **5Б**. В результате проведенного анализа зародышевые линии IGHV1-3*01, IGHV1-18*04, IGLV10-54*01, IGLV1-47*01 были идентифицированы как LMP1-реактивные; IGHV1-69*01, IGHV5-51*01, IGHV6-1*01 и IGLV3-19*01, IGKV1-39*01, как МВР-реактивные; IGHV4-59*07 показала кросс-реактивные свойства; и IGHV1-8*01 была классифицирована как полиреактивная (**Рис. 5Г и 5Д**). Предварительный анализ показал, что распределение длины H-CDR3 (**Рис. 5В**) соответствовало предыдущим данным об особенностях вариабельных областей антител против МВР. Наиболее часто встречающаяся длина H-CDR3 МВР-реактивных и кросс-реактивных-LMP1-МВР scFv составляла 16 аминокислотных остатков, в случае MOG-специфичных scFv длина составляла 18 аминокислотных остатков. Интересно, что распределение длин H-CDR3 имело очевидный минимум в зоне средних длин CDR (**Рис. 5В**). Проведенный количественный анализ демонстрирует, что VH MOG-специфичных антител принадлежали главным образом к сегментам

IGHV1-8 и IGHV1-69, тогда как анти-MBP и анти-LMP1 VH – в основном к IGHV4-59, IGHV5-51, IGHV3-23 и IGHV4-59.

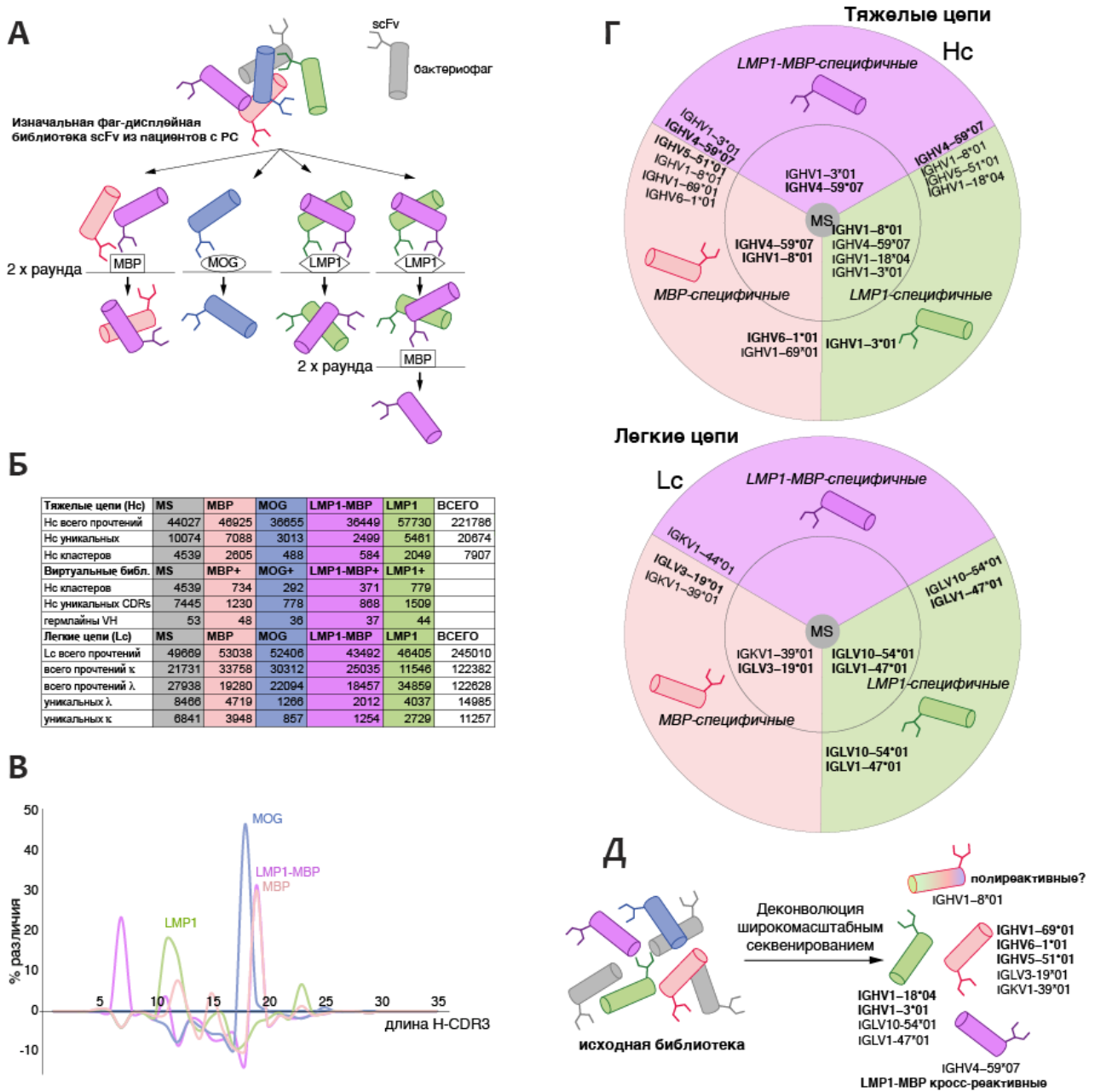


Рис. 5 Описание фаг-дисплейных библиотек одноцепочечных антител, обогащенных на MBP, LMP1 и MOG, с помощью метода широкомасштабного секвенирования. (А) Схема обогащения фаг-дисплейной библиотеки одноцепочечных антител. (Б) Основные характеристики отсеквенированных IGHV и IGLV для каждой из полученных библиотек. (В) Распределение длин H-CDR3 в отобранных библиотеках. (Г) Преобладание специфических зародышевых семейств в отобранных библиотеках по сравнению с исходной для VH (верхняя диаграмма) и VL (нижняя диаграмма). (Д) Отображение специфических зародышевых семейств, для которых выявлена тенденция к взаимодействию с различными антигенами.

Изучение молекулярного механизма убиквитин-независимой внутриклеточной деградации основного белка миелина

Внутриклеточную деградацию MBP изучали на клетках HEK293, трансфицированных кДНК, кодирующей белки MBP и GFP (Рис. 6А). MBP иммунопреципитировали из трансфицированных клеток HEK293, обработанных ингибитором протеасомы PS-341 (Bortezomib, Velcade) или ДМСО (Рис. 6Б). Анализ вестерн-блоттинга показал, что MBP не был убиквитинилирован, несмотря на накопление других полиубиквитинилированных белков в клетках, обработанных ингибитором протеасомы. Затем трансфицированные клетки обрабатывали циклогексимином (CHX) в присутствии или в отсутствие PS-341 и далее подвергали анализу вестерн-блоттингом (Рис. 6В). Количество MBP в клеточных

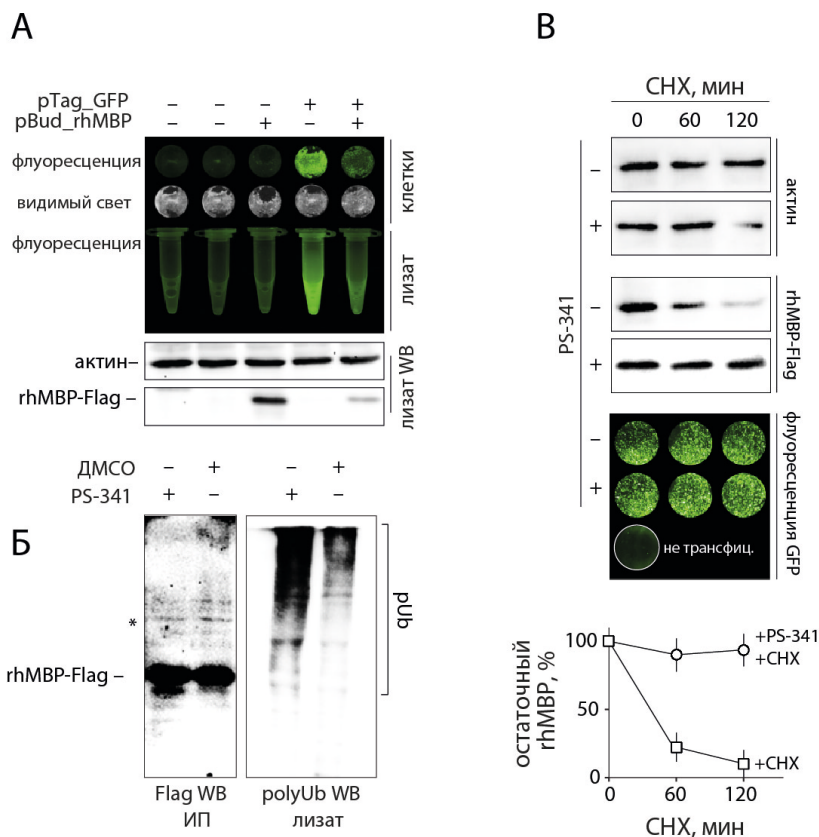


Рис. 6 (А) Клетки HEK, трансфицированные и не трансфицированные генетическими конструкциями, кодирующими рекомбинантный MBP человека (rhMBP) или GFP и вестерн-блоттинг (ВБ) их лизатов. В качестве контроля процедуры нанесения применяли гибридизацию этой же мембраны с моноклональными антителами к β -актину (актин) (Б) Клетки HEK трансфицировали генетической конструкцией, кодирующей MBP, через 24 часа обработали PS-341 или ДМСО, лизировали и провели иммунопреципитацию (ИП) с использованием антитела к FLAG-эпиту. Вестерн-блоттинг элюатов (слева), гибридизация с анти-FLAG антителом. Вестерн-блоттинг исходных лизатов (справа), гибридизация с антителом к полиубиквитиновым конъюгатам. (В) Определение скорости протеолиза белков в клетке с использованием циклогексимида (CHX).

лизатах быстро уменьшалось после добавления циклогексимида, в присутствии же PS-341 белок был стабилен. Полученные данные явным образом свидетельствовали, что MBP подвергается гидролизу протеасомой *in vivo*. Чтобы подтвердить отсутствие необходимости полиубиквитинилирования для гидролиза MBP в клетках млекопитающих, мы провели ряд экспериментов с использованием тус-слитного варианта убиквитина K0 (UbK0) и малых интерферирующих РНК (siRNA) к E1.

UbK0 представляет собой неполимеризуемый вариант убиквитина дикого типа и предотвращает рост полиубиквитиновых цепей вследствие замены всех функциональных остатков лизина на остатки аргинина. Лигаза E1 или UBE1 известна как Ub-активирующий фермент и является первым белком в каскаде полиубиквитулирования. Клетки HEK293 трансфицировали кДНК, кодирующими Ub WT или UbK0 (Рис. 7А), или же siRNA к E1 (Рис. 7В).

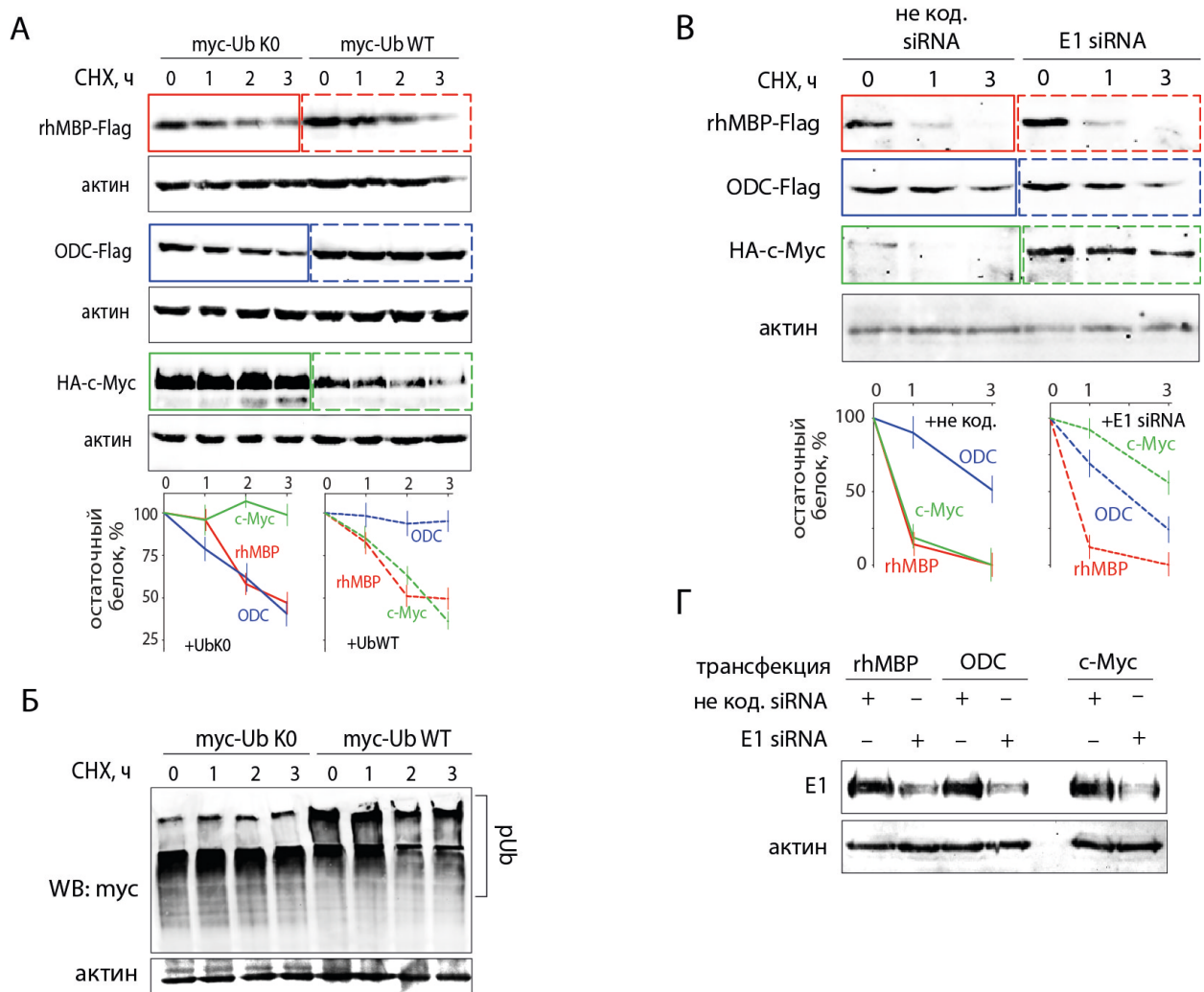


Рис. 7 (А) Вестерн-блоттинг лизатов клеток линии HEK, трансфицированных генетическими конструкциями, кодирующими вариант убиквитина K0 (UbK0) или убиквитин дикого типа (UbWT), слитных с myc-эпитопом, а также генетическими конструкциями, кодирующими MBP (rhMBP-Flag), c-Myc (HA-c-Myc) или орнитиндекарбоксилазу (ODC-Flag). Здесь и далее приведены различные временные точки обработки клеток циклогексимидом (CHX). В качестве контроля процедуры нанесения применяли гибридизацию этой же мембраны с моноклональными антителами к β -актину (актин). (Б) Вестерн-блоттинг тех же клеточных лизатов, что и в (А), гибридизация с анти-myc антителом для наблюдения за накоплением и протеолизом полиубиквитиновых конъюгатов. (В) Вестерн-блоттинг лизатов клеток линии HEK, трансфицированных генетическими конструкциями, кодирующими MBP, c-Myc или ODC, а также контрольной siRNA и E1 siRNA. (Г) Вестерн-блоттинг тех же клеточных лизатов, что и в (В), гибридизация с антителом к лигазе E1.

Спустя 24 часа клетки трансфицировали кДНК, кодирующими MBP, онкобелок с-Мус или орнитиндекарбоксилазу ODC, и далее обрабатывали циклогексимидом. Мы выбрали с-Мус и ODC в качестве функциональных контролей, поскольку протеасомальная деградация с-Мус происходит строго Ub-зависимо, тогда как ODC подвергается гидролизу протеасомой в присутствии белка антизима (AZ) без участия убиквитина. Как и ожидалось, ко-трансфекция UbK0 или E1 siRNA приводила к ингибированию протеасомального гидролиза и вызывала накопление белка с-Мус. Напротив, деградация ODC была независима от воздействия на систему убиквитинилирования. В соответствии с нашими предыдущими наблюдениями, MBP подвергался деградации протеасомой при любых условиях, независимо от ингибирующего воздействия на её отдельные компоненты.

Исходя из полученных данных было высказано предположение, что основной заряд является движущей силой гидролиза MBP протеасомой. Для проверки этой гипотезы мы создали три варианта MBP (**Рис. 8А**): (i) вариант MBP тип [R], в котором все 12 остатков лизина были замещены на остатки аргинина, (ii) вариант MBP тип [6Q], который является рекомбинантным «квази-дииминированным» аналогом природного изомера MBP C8 и имеет шесть замен остатков аргинина на остатки глутаминовой кислоты в позициях, где обнаруживается цитруллин у пациентов с РС, и (iii) вариант MBP [9Q], который представляет собой «рационально квази-дииминированный» вариант MBP с девятью заменами остатков аргинина на остатки глутаминина. Варианты MBP были наработаны в бактериальных клетках и далее очищены. Электрофорез в ПААГ, проведенный в нативных условиях (**Рис. 8Б**) подтвердил, что, как и ожидалось, общий основной заряд вариантов MBP уменьшался в порядке [R] > [WT] > [6Q] > [9Q]. Инкубация вариантов MBP с очищенной протеасомой выявила, что скорость их гидролиза положительно коррелирует со значением их основного заряда (**Рис. 8В**). Вариант MBP [R] подвергался деградации быстрее, чем [WT], тогда как скорость гидролиза вариантов [6Q] и [9Q] была значительно снижена. Чтобы создать альтернативу MBP – совершенно другой белок с точно таким же аминокислотным составом, мы получили кДНК, кодирующую последовательность MBP в обратном порядке от С- до N-конца. Важно отметить, что сам MBP и его «зеркальный» двойник были одинаково восприимчивы к внутриклеточной протеасомной деградации (**Рис. 8Г**). Таким образом, в настоящей работе мы показали, что композиция аминокислот, нежели конкретная аминокислотная последовательность, приводит к способности MBP подвергаться Ub-независимому

гидролизу протеасомой. На следующем этапе нам показалось интересным разработать искусственный МВР-подобный протеасомный дегрон.

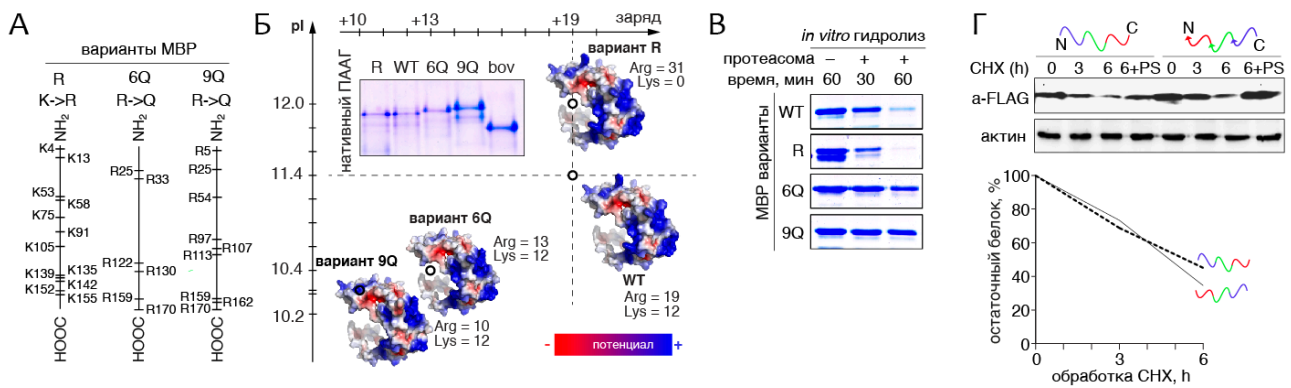


Рис. 8 (А) Аминокислотные замены в полученных вариантах МВР по сравнению с белком дикого типа (WT). (Б) Варианты МВР, расположенные в координатах общего заряда белка и теоретической изоэлектрической точки. Структуры, созданные программным обеспечением РуМОЛ (предсказанная модель основного белка миелина человека, PDB ID 1QCL), демонстрируют поверхностный электростатический потенциал вариантов МВР. (В) Гидролиз рекомбинантного человеческого МВР дикого типа и его вариантов очищенными протеасомами *in vitro*. (Г) Клетки НЕК293 трансфицировали кДНК, кодирующей МВР и его «зеркальным» вариантом. Через 24 часа клетки обрабатывали циклогексимидом (CHX) и инкубировали указанное время, далее клетки лизировали и анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против 3FLAG-эпитопа и актина.

Для этого мы проанализировали аминокислотный состав МВР (**Рис. 9А**) в сравнении с нормальным распределением аминокислот в протеоме человека. Для создания искусственного сигнала протеасомной деградации использовали аминокислоты, процент которых был аномально высоким (**Рис. 9А, вставка**). Белок дегидрофолатредуктаза (DHFR), удлиненный с С-конца 60-аминокислотным неструктурированным фрагментом белка ЕМВ1, использовали в качестве носителя искусственного сигнала, состоящего из девяти повторов 7-аминокислотного фрагмента, названного BEAD (Basic Elementary Autonomous Degron) (**Рис. 9Бi**). Нами была исследована деградация двух типов BEAD, содержащих в качестве основных якорей остатки лизина и аргинина (тип [KR]) или исключительно остатки аргинина (тип [R]) (**Рис. 9Бii**). Повторы BEAD обоих типов [R] и [KR] придали DHFR способность подвергаться гидролизу протеасомой. В то же время замена остатков аргинина на слабopоложительный глутамин (тип [Q]) значительно уменьшала скорость внутриклеточной деградации слитной с DHFR химеры.

Чтобы определить минимальное количество повторов BEAD, достаточное для взаимодействия с протеасомой, мы создали панель субстратов, представляющих собой DHFR, слитную с различным количеством повторов BEAD (**Рис. 9Бi**). Мониторинг их

внутриклеточной деградации показал, что 3 повтора BEAD были минимальным сигналом деградации, тогда как оптимальное количество повторов BEAD оценивалось от 3 до 7, что в свою очередь соответствует 21-49 аминокислотным остаткам (Рис. 9Вii).

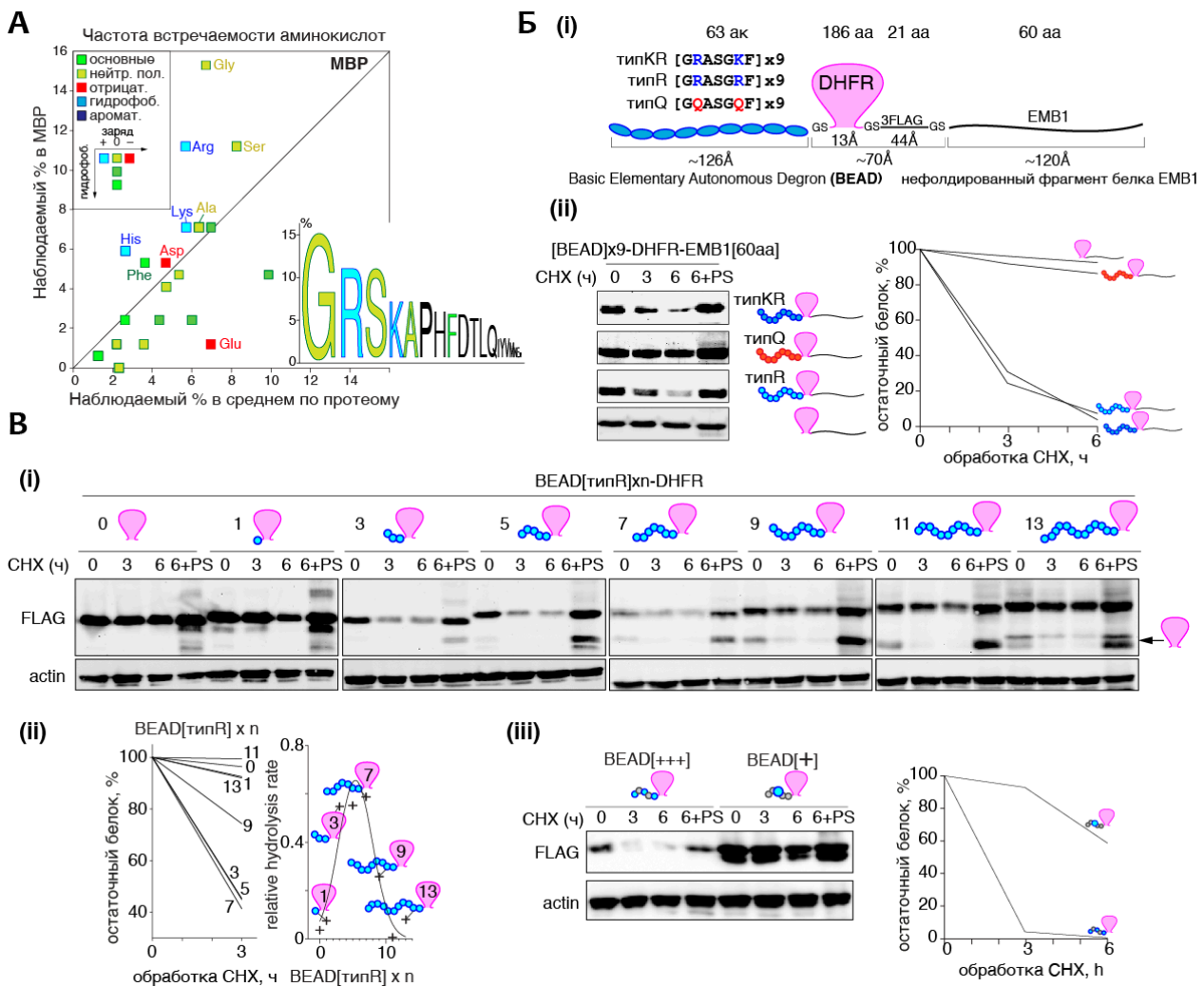


Рис. 9 (А) Анализ частоты встречаемости аминокислотных остатков в последовательности MBP по сравнению с протеомом человека. (Б) (i) Дизайн модельных субстратов, содержащих созданные дегроны, слитные с DHFR и Emb1(1-60). (ii) Клетки HEK293 трансфицировали кДНК, кодирующими слитные белки разработанных дегронов с DHFR и Emb1(1-60), через 24 часа клетки обрабатывали CHX, далее клетки лизировали в указанные временные промежутки и анализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антител против 3FLAG-эпитопа. Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные временные точки к изначальному количеству белка. (В) (i) Клетки HEK293 трансфицировали генетическими конструкциями, кодирующими слитные белки DHFR с различным числом BEAD повторов (n=0-13), через 24 часа клетки обрабатывали CHX и инкубировали указанные временные промежутки, далее клетки анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против 3FLAG-эпитопа. (ii) Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные временные точки к изначальному количеству белка. (iii) Клетки HEK293 трансфицировали генетическими конструкциями, кодирующими слитные белки DHFR с BEAD с делокализованными [+++] и кластеризованными [+] остатками аргинина, через 24 часа клетки обрабатывали CHX и инкубировали указанные временные промежутки, далее клетки анализировали, как указано в (А).

Интересно, что ингибирование протеасомы в процессе внутриклеточной деградации BEAD-DHFR приводило к накоплению частично процессированного субстрата, наиболее вероятно представляющего собой DHFR с полностью транскрированными повторами BEADs. Далее мы создали две вариации BEADs типа [R], в которых 6 остатков аргинина были расположены в центре 35-аминокислотного протеасомного сигнала деградации или, альтернативно, были равномерно распределены по его длине. В соответствии с полученными данными можно однозначно утверждать, что кластеризация положительно заряженных якорных остатков существенно менее предпочтительна в сравнении с их делокализацией (**Рис. 9Вiii**).

На следующем этапе нашей задачей было найти субъединицу протеасомы, которая осуществляет прямой захват МВР. Чтобы гарантировать, что наши последующие манипуляции не изменят общую экспрессию белка и глобальный клеточный метаболизм, МВР-кодирующая последовательность ДНК была интегрирована в кассету, содержащую внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), фланкированную последовательностью ДНК, кодирующей зеленый флуоресцентный белок ZsGreen. В результате экспрессия МВР была синхронизирована с экспрессией ZsGreen. Чтобы исключить возможность ингибирования или активации общего пула протеасом, мы получили клетки линии НЕК293, экспрессирующие искусственный Ub-зависимый субстрат – белок ZsGreen1, N-терминально слитый с Ub. Мы проверили, требуется ли АТФ для внутриклеточного гидролиза МВР. Чтобы выяснить это, мы истощали внутриклеточный АТФ путем введения смеси 2-дезоксид-глюкозы и 2,4-динитрофенола. В отличие от белка Ub-ZsGreen, гидролиз МВР все еще обнаруживался, и что еще более удивительно, истощение АТФ приводило к значительной потере стартового количества внутриклеточного МВР (**Рис. 10А**). Ингибирование протеасомы путем добавления PS-341 на фоне недостатка АТФ приводило к значительному количеству процессированного МВР, усеченного на N-конце – продукту, который мы не обнаружили ни в каких других условиях (**Рис. 10Аii**).

Наблюдаемая Ub- и АТФ-независимость протеасом-опосредованной деградации МВР свидетельствует об отсутствии значимой роли 19S-регуляторной субчастицы в этом процессе. Известно, что 26S-протеасома, лишенная Rpn10 или Rpn13, несет в основном тот же 19S регуляторный комплекс, тогда как подавление экспрессии hRpn2 приводит к появлению протеасомного комплекса, содержащего только гексамерное АТФазное кольцо – аналога дрожжевого PAN. Опираясь на эти данные, мы провели

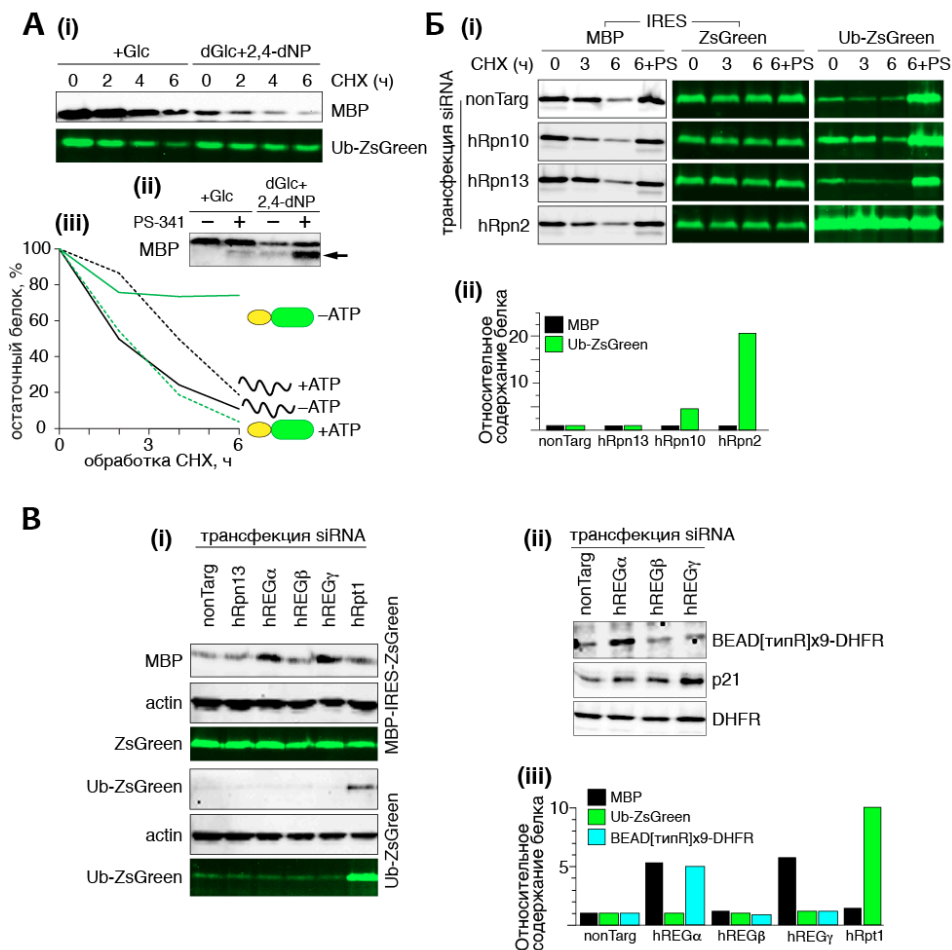


Рис. 10 (А) (i) Внутриклеточный гидролиз MBP и Ub-ZsGreen1 в клетках HEK293 в нормальных условиях (Glc) и при удалении АТФ [инкубация с 2-дезоксид-Д-глюкозой (dGlc) и 2,4-динитрофенолом (2,4-dNP)]. (ii) Образование частично процессированного продукта MBP. (iii) Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные временные точки к изначальному количеству белка. (Б) (i) Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие MBP-IRES-ZsGreen и Ub-ZsGreen, трансфицировали siRNA к указанным субъединицам 19S регуляторного комплекса. Через 48 часов клетки обрабатывали циклогексимидом (CHX) и инкубировали в течение указанных промежутков времени. Далее клеточные лизаты анализировали на предмет флуоресценции в ПААГ, а также иммуноблоттингом с использованием антител против 3FLAG-эпитопа. (ii) Относительное количество белка рассчитывали как отношение количества белка в клетках, трансфицированных соответствующими siRNA, к количеству белка в клетках, трансфицированных контрольными siRNA (nonTarg). (В) (i) Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие MBP-IRES-ZsGreen и Ub-ZsGreen, трансфицировали siRNA к указанным субъединицам REG, а также субъединицам Rpt1 и Rpn13. Через 48 часов клетки обрабатывали циклогексимидом и инкубировали в течение указанных промежутков времени. Далее клетки анализировали как указано выше; (ii) Клетки HEK293 трансфицировали конструкциями, кодирующими p21, DHFR или BEAD[R]-DHFR, через 24 часа клетки дополнительно трансфицировали siRNA к субъединицам REG и далее анализировали, как указано выше. (iii) Оценку относительного количества белка проводили, как описано выше.

трансфекцию клеток HEK293 siRNA, подавляющих экспрессию человеческих ортологов Ub-рецепторов hRpn10, hRpn13 или структурной субъединицы hRpn2. Как и ожидалось, Ub-ZsGreen в значительной степени накапливался при трансфекции siRNA, подавляющих экспрессию hRpn10 и hRpn2, тогда как количество белка ZsGreen было стабильным в присутствии всех исследованных siRNA (Рис. 10Б). Подавление экспрессии ни одной из трех субъединиц hRpn2/10/13 не оказало заметного влияния на протеасомальный гидролиз MBP (Рис. 10Б).

Затем мы проверили вклад других регуляторных частиц, известных как PA28 или 11S/REG, образующих гептамер, который стыкуется с 20S протеолитическим ядром в АТФ-независимом режиме. Результаты трансфекции siRNA, подавляющих экспрессию REG, свидетельствуют, что MBP накапливается в случае siRNA к REG α и REG γ , но не REG β (Рис. 10Bi). Количество Ub-ZsGreen, наоборот, не изменялось при ингибировании синтеза субъединиц REG, тогда как подавление синтеза АТФазы Rpt1 значительно увеличивало его внутриклеточную концентрацию (Рис. 10Bi). Затем мы оценили, зависит ли деградация BEAD от REG субъединиц. Подобно MBP, количество BEADs-

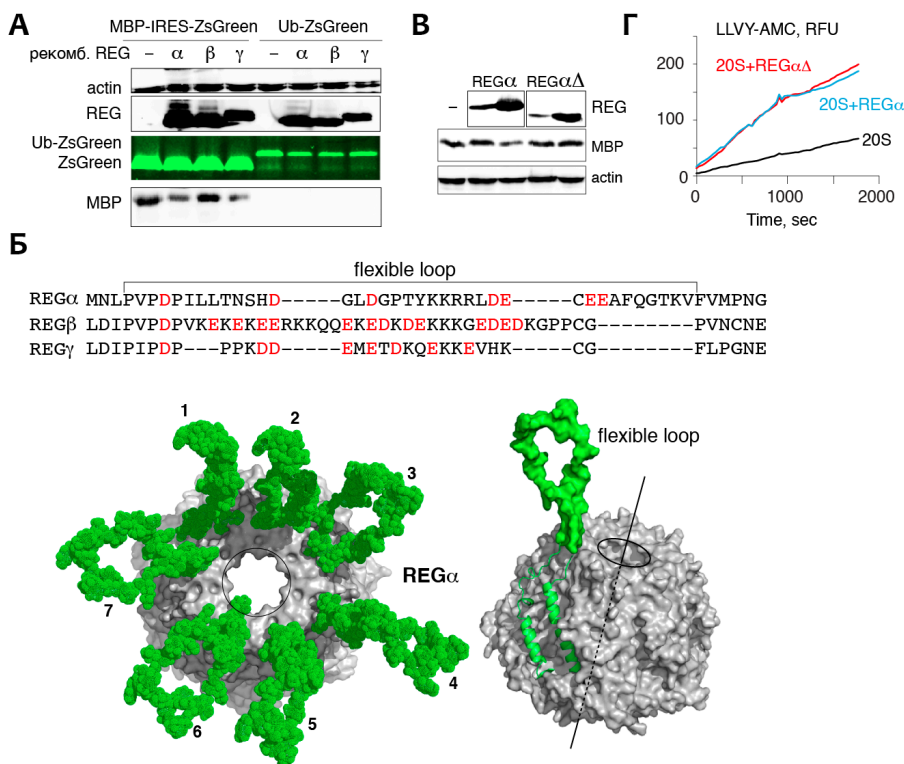


Рис. 11 (А) Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие MBP-IRES-ZsGreen и Ub-ZsGreen, трансфицировали генетическими конструкциями, кодирующими субъединицы REG, как указано. Через 48 часов клеточные лизаты анализировали на предмет флуоресценции в ПААГ, а также вестерн-блоттингом с использованием антител против 3FLAG-эпитопа и актина. (Б) Аминокислотные последовательности петли субъединиц REG. (В) Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие MBP-IRES-ZsGreen и Ub-ZsGreen, трансфицировали генетическими конструкциями, кодирующими субъединицы REG дикого типа и с заменой полярной петли на линкер (G4S)₆ (REG $\alpha\Delta$). Через 48 часов клеточные лизаты анализировали на предмет флуоресценции в ПААГ, а также иммуноблоттингом с использованием антител против FLAG-эпитопа и актина. (Г) Анализ активности протеасомы при добавлении REG дикого типа и REG $\alpha\Delta$.

DHFR было увеличено в клетках, трансфицированных REG α siRNA, тогда как белок p21, который, как известно, подвергается гидролизу REG γ -20S протеасомами, накапливался только при подавлении экспрессии REG γ (Рис. 10Bii).

Проведенная трансфекция клеток HEK293, экспрессирующих MBP, различными количествами кДНК, кодирующими субъединицы REG, показала, что суперэкспрессия REG α и REG γ увеличивала скорость внут-

рикеточного гидролиза MBP (Рис. 11А). Известно, что α - и β -субъединицы субчастицы REG образуют гетерогептамер, поэтому мы ко-трансфицировали кДНК, кодирующую REG α/β субъединицы, тем не менее каких-либо синергетических эффектов на внутриклеточный гидролиз MBP не наблюдалось. Детальный анализ аминокислотной последовательности субъединиц REG типа (Рис. 11Б) и доступной пространственной структуры гептамера REG α показал, что гибкие петли каждого из семи REG-мономеров обогащены полярными аминокислотами, включая кластеры аспартата и глутамата с результирующим pI \approx 5.0. Эти данные натолкнули нас на мысль, что основной заряд, присущий MBP и BEADs, должен иметь антипода в структуре REG анионного характера. Трансфекция MBP-экспрессирующих клеток линии HEK293 кДНК, кодирующей REG α без гибкой полярной петли, замещенной SG-линкером (REG $\alpha\Delta$), по сравнению с REG α дикого типа, привела к повышению стабильности MBP (Рис. 11В). При этом важно отметить, что и дикий тип, и REG $\alpha\Delta$ активируют протеасому с одинаковой эффективностью (Рис. 11Г).

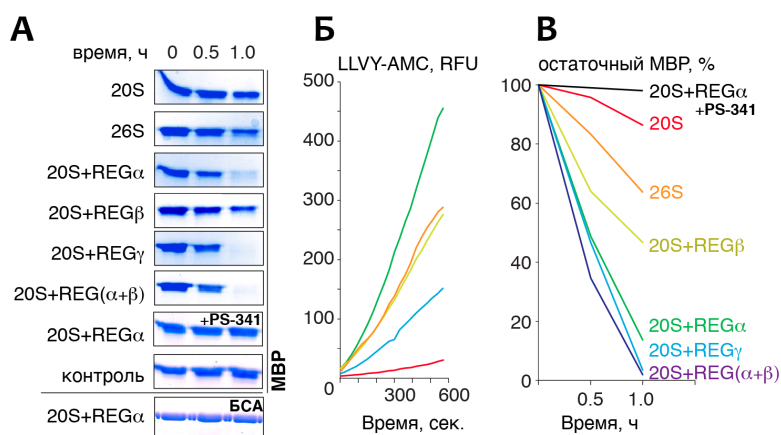


Рис. 12 (А) Гидролиз MBP очищенными препаратами 20S и 26S протеасомы, а также 20S протеасомой с различными регуляторами REG *in vitro*. Отмечена реакция с добавлением PS-341. BSA, инкубированный с комплексом 20S-REG α в аналогичных условиях, показан снизу. (Б) Активность протеасом с различными регуляторами, измеренная с использованием субстрата LLVY-AMC. (В) Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные моменты времени к исходному количеству белка.

Анализ гидролиза MBP протеасомами *in vitro* показал, что добавление REG α и REG γ к 20S протеасоме значительно ускоряло гидролиз MBP, тогда как регуляторная частица 19S и REG β имели лишь умеренный эффект (Рис. 12А).

Интересно, что усиление химотрипсиновой активности различными регуляторами (Рис. 12Б), не имело явной корреляции со скоростью гидролиза MBP (Рис. 12В).

Наиболее явная разница была получена в случае REG γ , которая активировала протеасому по меньшей мере в три и в два раза менее эффективно, чем REG α и REG β соответственно, и в то же время усиливала гидролиз MBP более эффективно, чем REG β , и

сравнимо с REG α . Чтобы исследовать силу взаимодействия MBP с REG, мы использовали метод SPR. Субъединица REG α , слитая с мальтозосвязывающим белком (MaltBP), пропусклась через сенсорный чип, содержащий иммобилизованный MBP. Нами была определена константа диссоциации комплекса MBP с REG α , которая составила 0.2 мкМ, что в два раза слабее взаимодействия Ub₄-hRpn10 и в десять раз сильнее взаимодействия MBP-hRpn10 (Рис. 13). Важно отметить, что «квазидеиминированный» вариант MBP [9Q] связывал REG α значительно менее эффективно при результирующей K_D 2 мкМ (Рис. 13, верхняя панель).

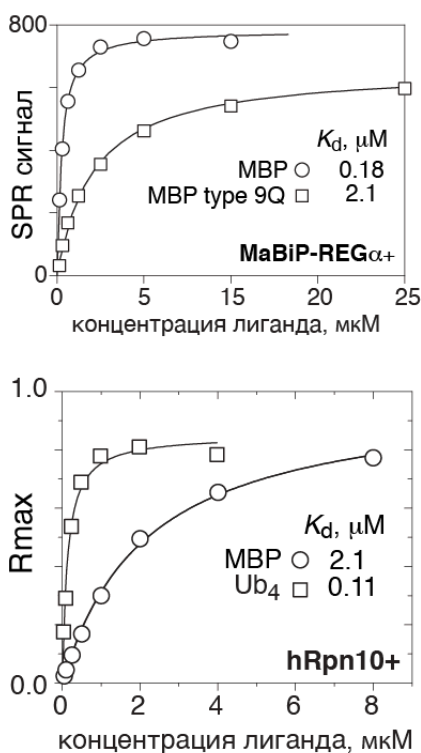


Рис. 13 Кривые насыщения, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса, отражающие взаимодействие между иммобилизованным на чипе MBP или «псевдо-деиминированным» MBP (6Q) с MaBiP-REG α (верхняя панель). Кривые титрования, отражающие взаимодействие между иммобилизованным на чипе MBP или тетра-убиквитином с субъединицей протеасомы hRpn10 (нижняя панель). Rmax – уровень максимального насыщения, рассчитанный для каждой кривой, исходя из теории мономолекулярной адсорбции Ленгмюра 1:1.

Теоретическое осмысление принципа заряд-опосредованного гидролиза MBP протеасомой без убиквитина приводит к выводу, что подобного эффекта возможно добиться не только основными аминокислотами, но и различными катионными химическими веществами. Для проверки этой гипотезы мы осуществили химическую конъюгацию BSA со спермином, 1,3-диаминопропаном и 3-аминопропанолом в присутствии и отсутствии REG α . Реакционные смеси анализировали электрофоретически в ПААГ.

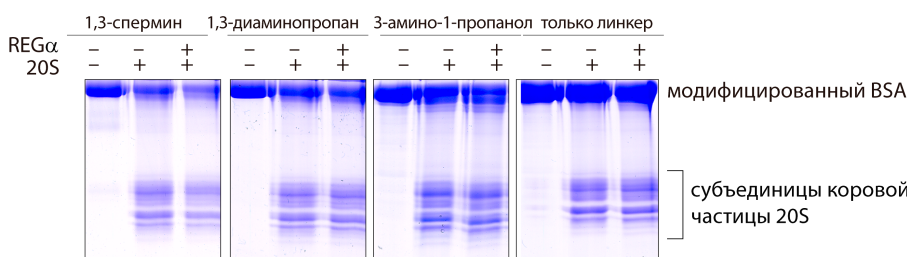


Рис. 14 Конъюгаты BSA со спермином, 1,3-диаминопропаном и 3-аминопропанолом инкубировали с протеасомой в присутствии и отсутствии REG α . Реакционные смеси анализировали электрофоретически в ПААГ.

через бифункциональный NHS-PEG₆-малеимидный линкер. Анализ *in vitro* гидролиза очищенных конъюгатов BSA изолированной 20S протеасомой с добавлением или без

REG α показал, что конъюгация со спермином и в значительно меньшей степени с 1,3-диаминопропаном в отличие от 1,3-диаминопропанола конвертирует BSA в Ub-независимый протеасомный субстрат (Рис. 14).

Изучение патофизиологической значимости расщепления миелина различными типами протеасом

Чтобы определить, накапливаются ли иммунопротеасомы в ЦНС при протекании ЕАЕ, мы окрашивали лизаты различных отделов головного мозга мышей линии BALB/c и неиммунизированных SJL, а также SJL мышей, развивающих ЕАЕ, на предмет наличия конститутивных и иммуносубъединиц протеасомы. Вестерн-блот анализ показал, что экспрессия $\beta 1i$ и $\beta 5i$ была значительно повышена во всех отделах головного мозга мышей SJL с ЕАЕ по сравнению с интактными мышами SJL и BALB/c (Рис. 15). Следующей задачей было определение источника иммунопротеасомы в головном мозге мышей при протекании аутоиммунной демиелинизации. В частности, мы хотели определить, привносится ли иммунопротеасома нерезидентными клетками внутрь ЦНС или же она образуется непосредственно в церебральных клетках. По сравнению с неиммунизированными мышами линии SJL, мыши, развивающие ЕАЕ, содержали в головном мозге значительно большее количество $\beta 1i$ и меньше нейрального маркера NeuN (Рис. 16А и 16Б). Поскольку содержание $\beta 1i$ по сравнению с $\beta 5i$ было значительно увеличено в головном мозге мышей с ЕАЕ, нами было проведено окрашивание срезов головного мозга мышей линии SJL с ЕАЕ на иммуносубъединицы $\beta 1i$ и $\beta 5i$.

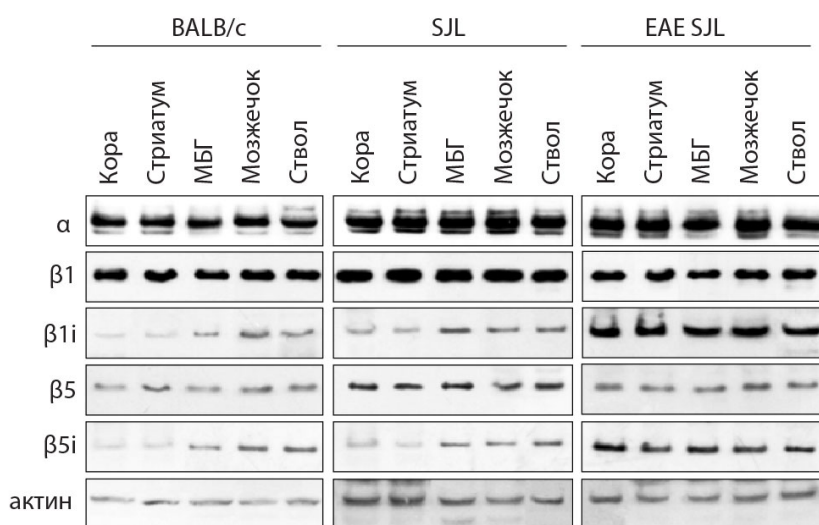


Рис. 15 (А) Вестерн-блоттинг гомогенатов различных отделов головного мозга мышей на предмет наличия субъединиц конститутивной ($\beta 1/\beta 5$) или иммунной протеасомы ($\beta 1i/\beta 5i$). МБГ – медиобазальный гипоталамус.

Полученные результаты свидетельствуют, что эти иммуносубъединицы не колокализованы, а значит находятся в разных клетках (Рис. 16В). Далее мы провели окрашивание срезов головного мозга мышей линии SJL с ЕАЕ антителами, распознающими МВР

и CD3, маркеры олигодендроцитов и Т-клеток, соответственно (Рис. 16Г). Таким образом нами было показано, что $\beta 1i$ колокализуется с МВР, а значит присутствует в олигодендроцитах, в то время как $\beta 5i$ была ассоциирована с CD3-положительными клетками, которые представляют собой инфильтрирующие через ГЭБ лимфоциты.

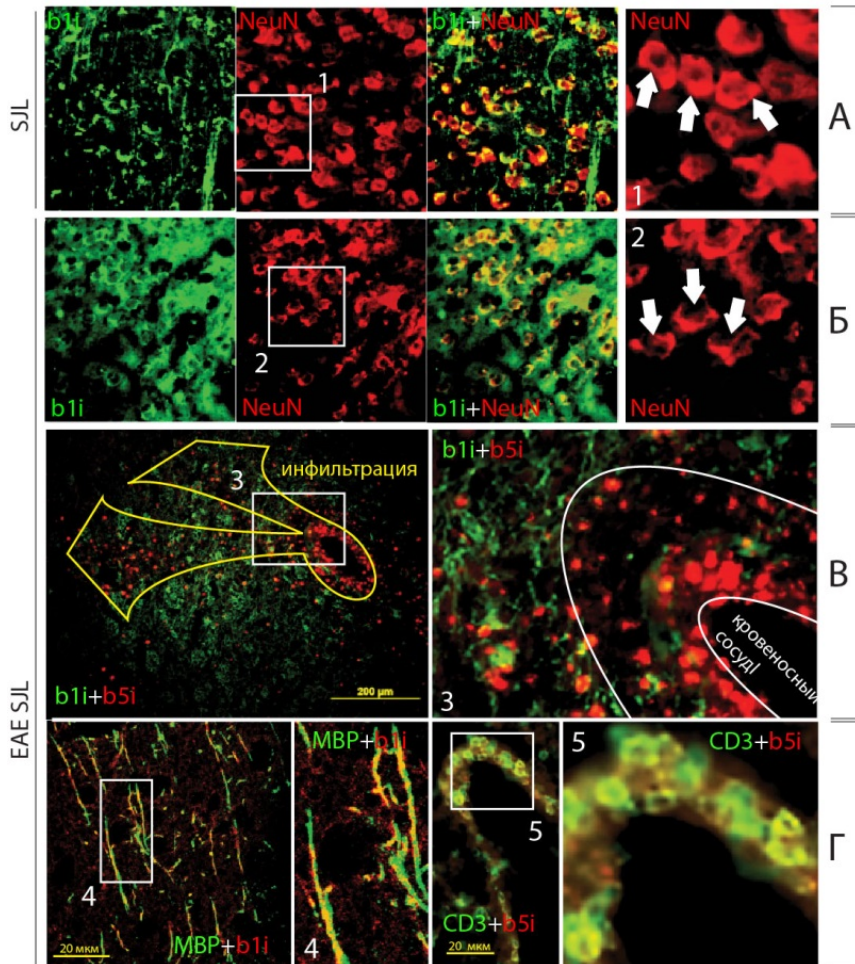


Рис. 16 Иммуногистохимический анализ срезов головного мозга неиммунизированных мышей линии SJL (А) и мышей линии SJL, развивающих ЕАЕ (Б–Г).

Важно отметить, что в первичной культуре зрелых олигодендроцитов также наблюдалось увеличение количества $\beta 1i$ при воздействии интерферона-гамма (Рис. 17). Исходя из полученных данных, стало очевидным, что убиквитин-независимый протеолиз МВР протеасомами из ЦНС здоровых мышей и мышей с ЕАЕ может приводить к различным спектрам пептидных фрагментов. Проведенный безметочный анализ явно продемонстрировал

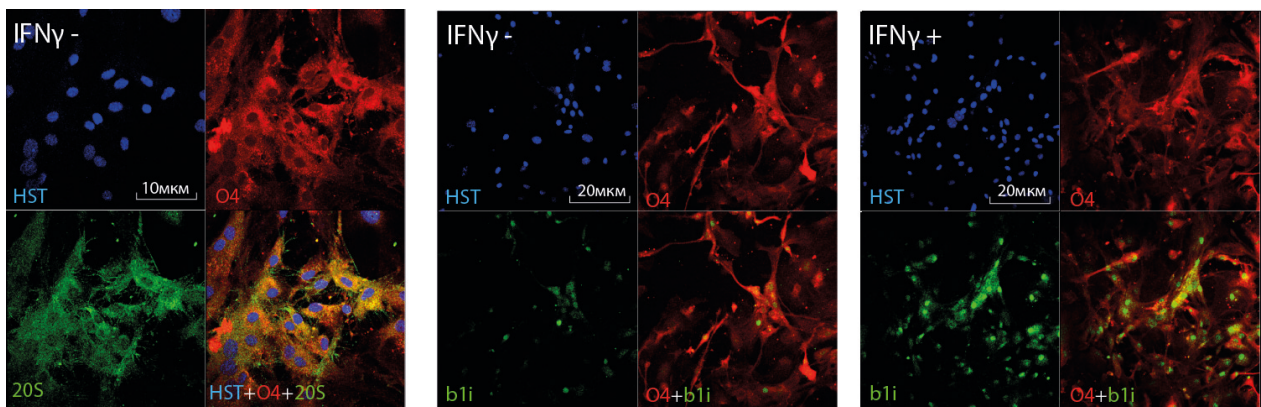


Рис. 17 Иммуноцитохимический анализ культуры олигодендроцитов, обработанных (правая панель) и не обработанных интерфероном-гамма (левая и средняя). O4 – маркер олигодендроцитов (красный), HST – Hoechst (синий), 20S или $\beta 1i$ (зеленый).

необходимость строго количественного сравнения относительного содержания пептидов МВР в протеасомных гидролизатах. Для этого был разработан метод, основанный на применении воды, содержащей нуклид кислорода ^{18}O . При каждом элементарном гидролитическом акте разрушения пептидной связи под действием протеасомы на С-конец образующегося пептида встраивается атом кислорода из молекулы воды. Протеолиз МВР протеасомой из головного мозга мышей линии BALB/c проводили в воде, содержащей ^{18}O , в то время как гидролиз протеасомой из мышей SJL проводили в обычной воде, содержащей ^{16}O . Таким образом, пептиды, полученные при гидролизе МВР соответствующими протеасомами, будут отличаться друг от друга на 2 единицы молекулярной массы, но обладать в точности одинаковым временем удерживания на обращенно-фазовом сорбенте и одинаковой эффективностью ионизации. Количество протеасомы, необходимой для гидролиза, выравнивали исходя из ее активности по пептидному субстрату Suc-LLVY-AMC. Для компенсации природного изотопного распределения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ гидролизаты МВР двумя типами протеасом смешивали в нескольких разных молярных соотношениях. Это позволило осуществить количественный анализ образования более чем 250 фрагментов МВР под действием протеасом из мышей линий BALB/c и SJL с и без EAE (Рис. 18). Из этого количества 5 пептидов по структуре подходили для загрузки на МНС I. Количество двух из этих пептидов, DTGILDSL (МВР₃₃₋₄₀) и ENPVVHFF (МВР₈₃₋₉₀) увеличивалось в 10 раз при гидролизе МВР протеасомой из мозга EAE SJL в сравнении с гидролизом МВР протеасомой из мозга мышей линии BALB/c.

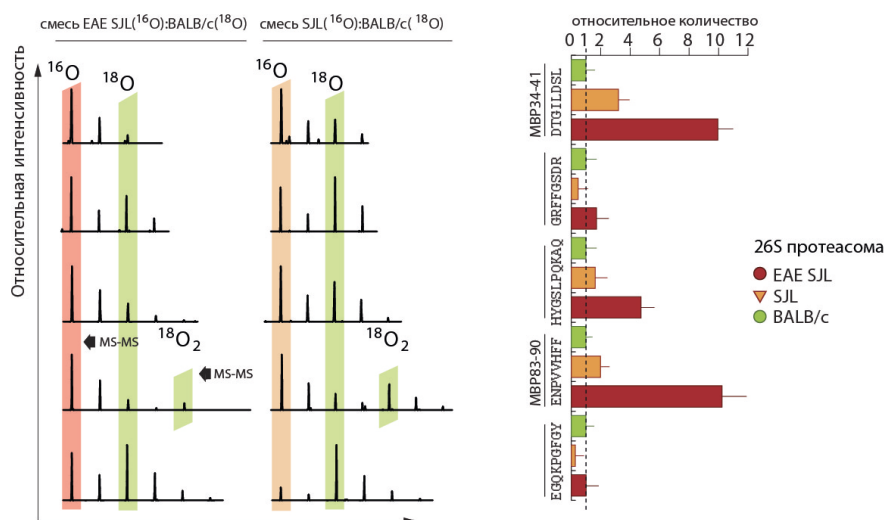


Рис. 18 Пример участка масс-спектра, полученного при анализе с использованием воды, содержащей нуклид кислорода ^{18}O (левая панель). Количественная оценка некоторых пептидов МВР, образующихся под действием протеасом. Данные пептиды по длине подходят для загрузки на МНС I (правая панель).

В отличие от других проанализированных пептидов, согласно результатам MS2 спектра, МВР₈₃₋₉₀ содержал на С-конце два атома ^{18}O вместо одного. Предположительно,

это результат двойной реакции гидролиза, которая становится возможной в результате повышенного сродства этого пептида к каталитической полости протеасомы.

Пептид MBP₈₃₋₉₀ является частью энцефалитогенного фрагмента MBP, поэтому мы более детально изучили его образование при действии различных типов протеасомы на MBP. Для этого был синтезирован химически идентичный пептид с С-концевым остатком фенилаланина, все атомы углерода и азота которого обладали массовыми числами 15 и 13, соответственно. Результаты количественного анализа с использованием подобного внутреннего стандарта полностью подтвердили ранее полученные данные. Скорость образования пептида MBP₈₃₋₉₀, рассчитанная исходя из известного количества внутреннего стандарта, заранее введенного в гидролизат MBP протеасомой, оказалась до 8 раз больше при гидролизе MBP протеасомой из мозга EAE SJL, чем при гидролизе протеасомой из мозга неиммунизированных мышей линии SJL и мышей линии BALB/c (**Рис. 19**). За 24 часа под действием протеасомы из головного мозга EAE-SJL образуется порядка 0.83 моль пептида ENPVVHFF на 1 моль изначального MBP.

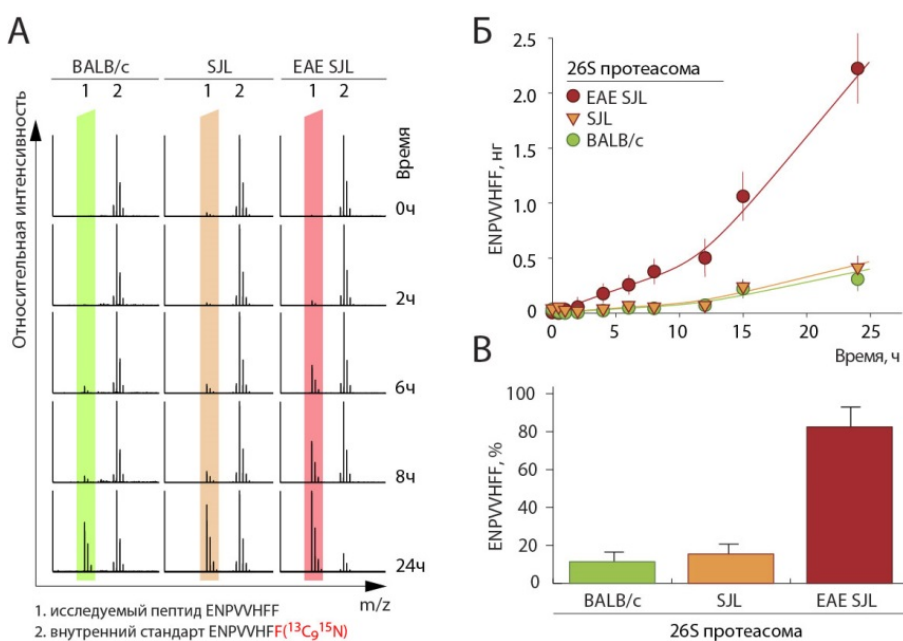


Рис. 19 Определение скорости образования пептида ENPVVHFF с использованием синтетического изотопно-меченного аналога. Масс-спектр (А), зависимость количества образовавшегося пептида от времени протеолиза (Б) и количество ENPVVHFF, образовавшегося за 24 часа гидролиза MBP протеасомой из головного мозга мышей BALB/c, SJL и EAE SJL (в процентах от количества исходного MBP) (В).

На следующем этапе работы из мышей линии SJL методом активации *ex vivo* были получены цитотоксические Т-лимфоциты, специфичные к ENPVVHFF. В качестве контроля использовались цитотоксические Т-лимфоциты, специфичные к пептиду вируса энцефалита Тэйлера FNFTAPFI. Цитотоксические ENPVVHFF-реактивные Т-лимфоциты специфически лизировали олигодендроциты, полученные из мышей линии SJL, при этом этот процесс ингибировался анти-МНС I антителами и его эффективность

значительно увеличивалась в случае олигодендроцитов, обработанных интерфероном-гамма.

Создание модульных бифункциональных иммунотоксинов, способных к узконаправленной элиминации заранее predeterminedенных популяций патологических лимфоцитов.

Сложность и неоднородность аутоиммунных аномалий, даже в рамках одного классифицированного заболевания, такого как рассеянный склероз, приводят к отсутствию эффективного лечения. Сложившаяся ситуация, вероятно, потребует дальнейшего развития терапии благодаря так называемой персонализированной медицине. Хотя известно, что CD4+ Т-клетки играют первую скрипку в патогенезе РС, роль В-клеток не следует недооценивать. Терапевтическое вмешательство, направленное на патогенные аутореактивные В-клетки, может стать универсальным подходом для лечения различных аутоиммунных аномалий, включая РС. Для решения поставленной задачи – разработать белки-киллеры патологических В-клеток – вместо антитела возможно использование иммунодоминантных фрагментов антигенов, по отношению к которым В-клеточные рецепторы (БКР) аутореактивных лимфоцитов обладают высокой аффинностью и избирательностью.

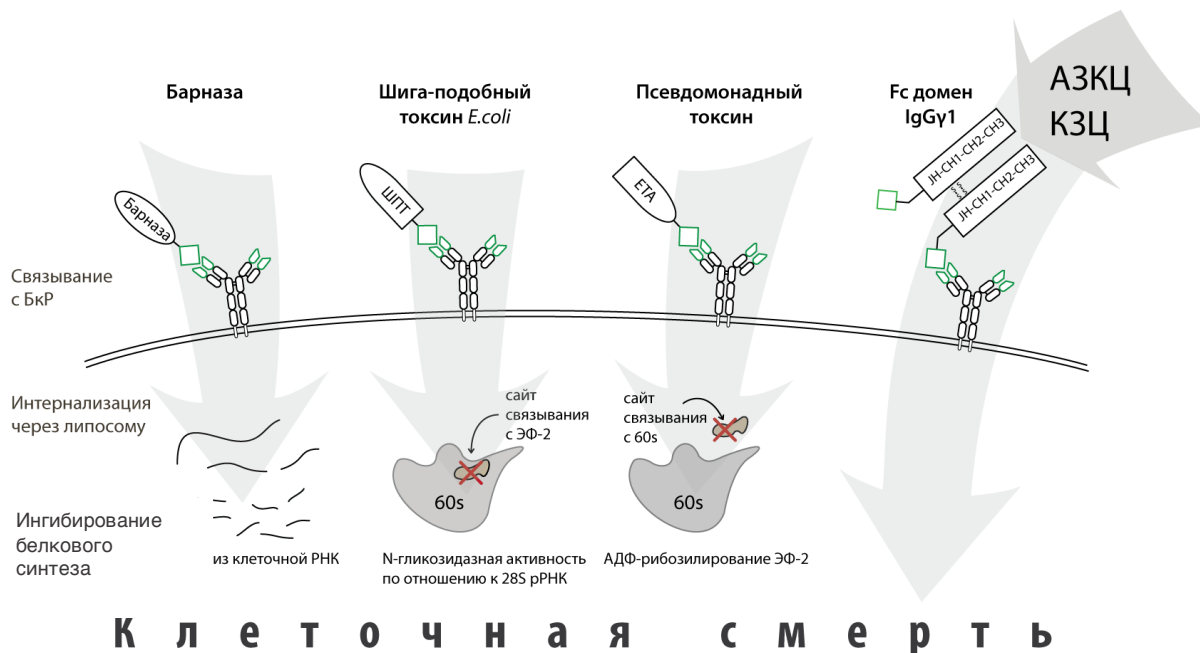


Рис. 20 Схематическое изображение выбранных механизмов специфической элиминации аутореактивных В-клеток.

В результате анализа литературных данных в качестве цитотоксической составляющей иммунотоксинов были выбраны: РНКаза барназа, каталитические домены

псевдомонадного токсина (ETA) и шига-подобного токсина *E. coli* (ШПТ), а также константный домен иммуноглобулина мыши и человека (Fc домен IgG), каждый из которых приводит к гибели клетки-мишени по различному механизму (Рис. 20).

Для сравнения цитотоксического потенциала полученных иммунотоксинов (ИТ) выделенные рекомбинантные белки, сопряженные с мус эпитопом, инкубировали с гибридной линией клеток С-МУС; в качестве отрицательного контроля использовали гибридную линию клеток 1В4F4, не несущую на своей поверхности анти-мус БКР. В качестве отрицательного контроля для белков барназа-мус и Fc-linker-мус использовали барназу и Fc-linker, не содержащих мус эпитопа. На основании полученных результатов была определена LD₅₀ рекомбинантных ИТ для клеток линии С-МУС (Табл. 1). Наиболее сильным цитотоксическим действием обладает рекомбинантный псевдомонадный токсин, однако данный ИТ продемонстрировал и наиболее высокую неспецифическую цитотоксичность. Шига-подобный токсин показал средние показатели специфичности и цитотоксичности на модельных клетках. Для дальнейшей работы нами были выбраны ИТ на основе барназы и Fc домена антитела, так как они показали наименьшую степень неспецифического цитотоксического действия, и эффективно элиминировали клетки-мишени.

Табл. 1 Значения LD₅₀ действия полученных иммунотоксинов на модельную линию клеток С-МУС.

Рекомбинантный ИТ	мус	LD ₅₀
псевдомонадный токсин	+	0,05 мкМ
шига-подобный токсин <i>E. coli</i>	+	0,44 мкМ
барназа	+	0,11 мкМ
	–	> 10 мкМ
Fc домен IgG _γ 1	+	~0.002 мкМ
	–	> 10 мкМ

Далее, в контексте изучения терапевтического потенциала созданных ИТ являлось проведение селективной элиминации аутореактивных МВР-специфичных В-клеток *in vivo* в мышцах линии SJL с индуцированным ЕАЕ. В результате тестирования

панели созданных ИТ на предыдущих этапах наиболее перспективными оказались ИТ на основе барназы и константного домена иммуноглобулина. Для финального теста из двух озвученных кандидатов нами был выбран константный домен иммуноглобулина. Для формирования популяции аутореактивных В-клеток, специфичных к МВР, ЕАЕ был индуцирован у мышей линии SJL. Для этого животным производили двукратные подкожные инъекции гомогената спинного мозга мыши в эмульсии ПАФ, дополнительно для усиления развития ЕАЕ в те же дни животным внутривенно вводили раствор Pertussis toxin.

Мышей с индуцированным ЕАЕ разделили на 5 экспериментальных групп по 10 голов в каждой: (1) без терапии; (2) животным однократно вводили 200 мкг Сорахоне (группа – Сорахоне); (3) животным в каждой группе дважды внутривенно вводили рFm (константный фрагмент иммуноглобулина, группа - рFm), (4) рFm-7 (константный фрагмент иммуноглобулина, слитный с фрагментом МВР QDENPVVHFFKNIVTPRTPPP-SQG, группа – рFm7) или (5) рFm-11 (константный фрагмент иммуноглобулина, слитный с фрагментом МВР RASDYKSANKGFKGVDAQGTLSKIFKL, группа – рFm-11). На 23 день после начала эксперимента культуры спленоцитов, полученные из этих мышей, анализировали на наличие В-клеток, специфичных к иммунодоминантному и С-концевому фрагментам МВР. Для этого клетки инкубировали с пептидами МВР₈₁₋₁₀₄ (7) и МВР₁₄₆₋₁₇₀ (12), конъюгированными с биотином. Для визуализации В-клеток использо-

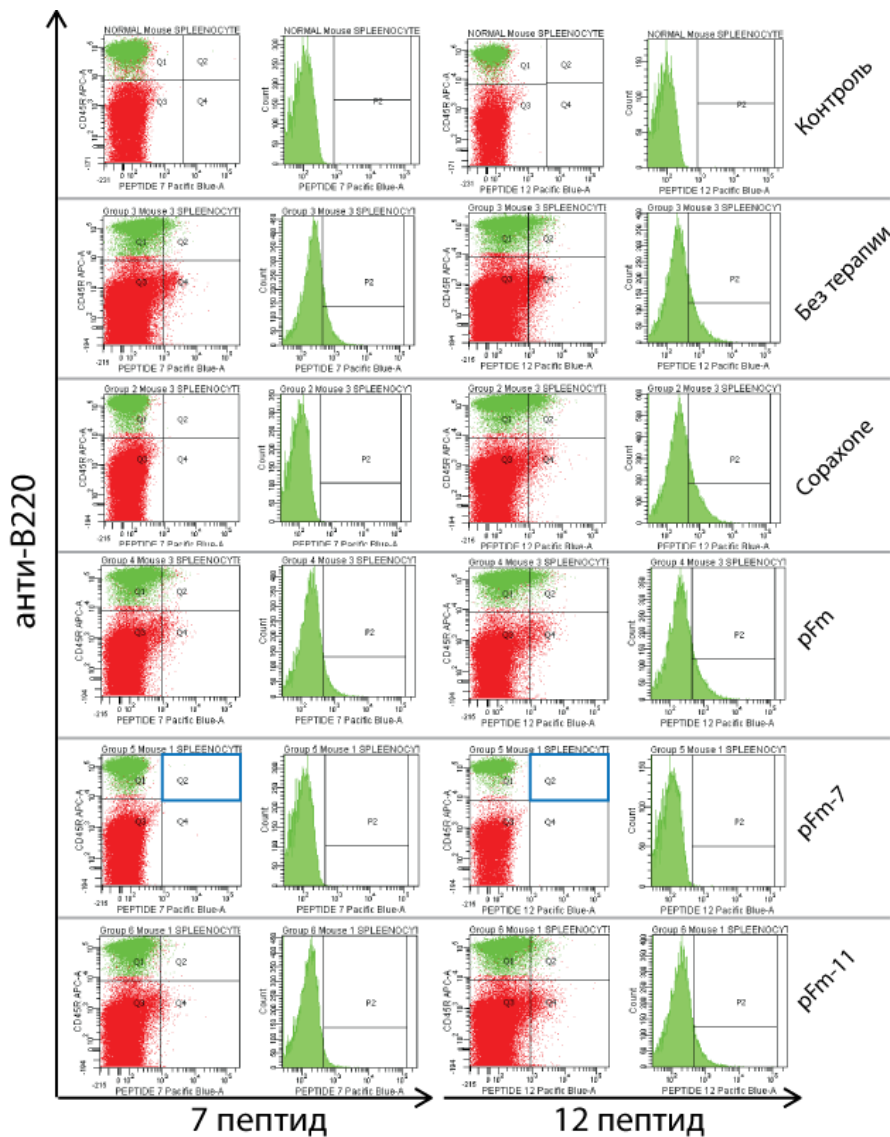


Рис. 21 Анализ изолированных спленоцитов на наличие В-клеток, специфичных к 7 и 12 фрагментам МВР, методом проточной цитофлуориметрии.

вали конъюгат анти-B220 антител с флуорофором APC (eBioscience), в свою очередь биотинилированные пептиды МВР, связанные с поверхностными БКР, детектировали добавлением конъюгата стрептавидина с флуорофором Pacific Blue. Образцы анализировали методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACSDiva (BD), результаты представлены на (Рис. 21). Как видно из рисунка, у мыши из группы

“контроль” отсутствовала популяция В-клеток, специфичных к МВР, в то время как в культуре спленоцитов, полученной из животного из группы “без терапии”, существует значительная популяция В-клеток, специфичных к обоим пептидам МВР. При однократном введении препарата Сорахоне, в культуре клеток оставалась популяция В-клеток, имеющих на своей поверхности БКР, специфичный только к 12 фрагменту МВР. Данное наблюдение в очередной раз подтверждает, что терапевтическое действие Сорахоне направленно на популяцию В-клеток, специфичных к иммунодоминантному эпитопу МВР (7 пептиду). Как и ожидалось, внутривенные инъекции контрольного белка рFm, не содержащего пептидов МВР, а также контрольного белка рFm-11 не привело к подавлению целевой популяции В-клеток. В свою очередь, введение рFm-7 приводило к полной элиминации В-клеток, специфичных не только к 7 фрагменту, который присутствует в составе ИТ рFm-7, но и к 12 фрагменту. Таким образом, после терапии ИТ рFm-7, пул В-клеток, специфичных к МВР, в культуре спленоцитов из леченой мыши совпадал с профилем здорового неиммунизированного животного. Полученные результаты позволяют предположить, что ИТ рFm-7 наряду с селективной элиминацией В-клеток, специфичных к иммунодоминантному фрагменту МВР (7), также подавляет формирование В-клеток, специфичных к 12 фрагменту МВР.

Разработка подходов к индукции иммунотолерантности при аутоиммунной нейродегенерации инкапсулированными фрагментами аутоантигенов

На основе имеющихся данных мы выбрали три иммунодоминантных пептида МВР₄₆₋₆₂ (р1), МВР₁₂₄₋₁₃₉ (р2) и МВР₁₄₇₋₁₇₀ (р3) для оценки их терапевтического потенциала. Для проведения процедуры инкапсуляции (**Рис. 22А**) липосомы получали из яичного фаосфатидилхолина с добавлением одного молярного процента ManDOG (mSUV) или без него (SUV). Для получения количественных данных, демонстрирующих интернализацию липосомных препаратов, мы выделили периферические дендритные клетки из крови крыс и далее инкубировали их с маннозилированными и неманнозилированными липосомами, нагруженными с-тус-пептидом, в различных концентрациях (**Рис. 22Б**). Результаты эксперимента свидетельствуют, что дендритные клетки поглощают маннозилированные липосомы значительно более эффективно, нежели неманнозилированные. Далее мы протестировали наличие усиления терапевтического действия при инкапсуляции МВР-пептидов в липосомы и добавлении маннозилированного компонента к липидной композиции. С этой целью DA-крысам с ЕАЕ,

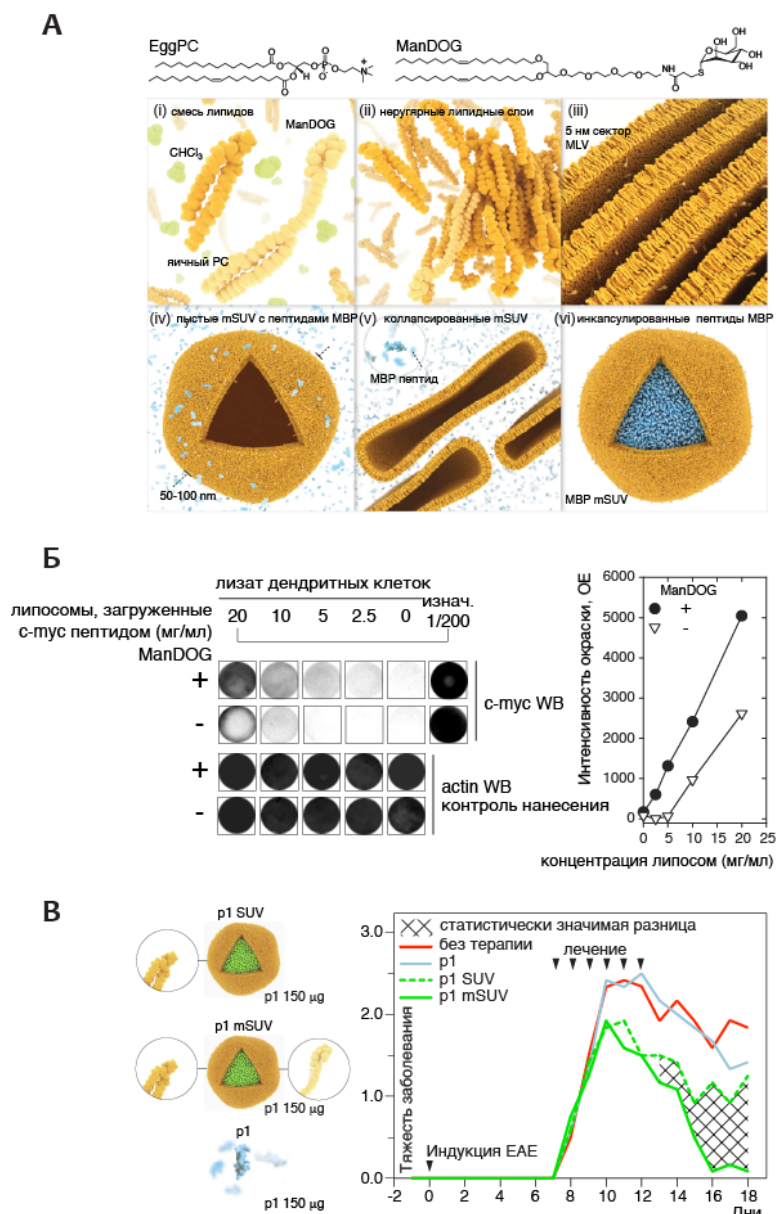


Рис. 22 (А) Химические формулы липидов Egg PC и MannDOG, использованных для создания липосом. Ниже представлен процесс получения липосомных наноконтейнеров. (Б) Сравнение эффективности интернализации полипептида, содержащего мус эпитоп, в составе липосом с MannDOG и без. Гибридизация клеточного лизата дендритных клеток с антителами к мус эпитопу и актину. Справа представлен денситометрический анализ количества интернализованного мус пептида. (В) Профили развития EAE у крыс линии DA при различных видах терапии.

поверхности (**Рис. 23А**). Полученные липосомы имели диаметр приблизительно 85 нм, обладали слегка отрицательным зарядом (от -7,5 до -10,5 мВ) и содержали в инкапсулированном виде более 90% исходного количества пептида. Для тестирования этих mSUV в терминах их терапевтической эффективности, полученные композиции подкожно вводили крысам DA с индуцированным EAE (**Рис. 23Б**).

индуцированным иммунизацией MBP₆₂₋₈₄, подкожно вводили пептид p1 как таковой или инкапсулированный в маннозилированные или неманнозилированные липосомы (**Рис. 22В**). Непосредственно сам пептид не проявлял обнаружимого терапевтического эффекта, тогда как тот же пептид, инкапсулированный в липосомы, значительно ингибировал развитие EAE. Более того, маннозилированные липосомы, нагруженные p1, были, очевидно, более эффективными, чем аналогичные по заполнению неманнозилированные липосомы.

Для анализа действия каждого из трех пептидов MBP и их смеси, мы подготовили четыре липосомных препарата, в которых эти три пептида по отдельности и их эквимольная смесь были инкапсулированы в липосомы, несущие остатки маннозы на их

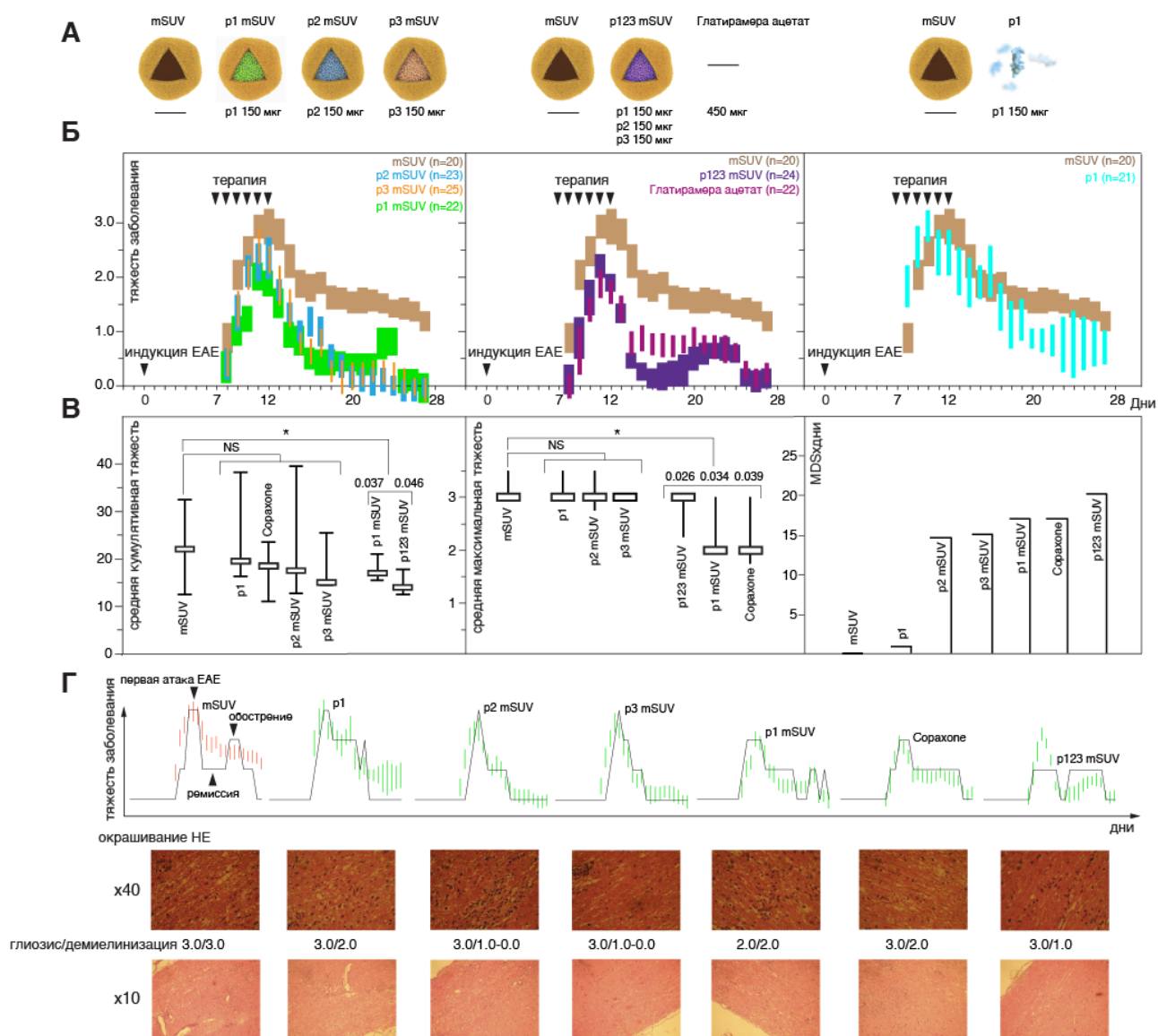


Рис. 23 Терапия экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита в крысах линии DA иммунодоминантными пептидами MBR, инкапсулированными в липосомы. (А) Схематическое изображение вводимых композиций с указанием состава и количества инкапсулированных пептидов. (Б) Экспериментальные группы животных оценивали по усредненной степени развития симптомов заболевания. (В) Сравнительный анализ средней кумулятивной и средней максимальной степени развития EAE у DA крыс в различных экспериментальных группах (В, левая и средняя панель, соответственно). Сопоставление интегральной терапевтической эффективности (произведение тяжести развития заболевания на дни) пептидов MBR в составе липосом по сравнению с контролем (В, левая панель). (Г) Из каждой экспериментальной группы было выбрано животное с профилем развития EAE (сплошная линия), наиболее приближенным к среднему профилю по всей группе (продольные зеленые и красные линии). Ниже представлен гистологический анализ повреждений в ЦНС у соответствующих крыс линии DA с индуцированным EAE в различных экспериментальных группах.

Терапия была начата на 7-й день после индукции EAE, то есть во время первых клинических проявлений заболевания. Каждая крыса получила шесть ежедневных инъекций тестируемых варинатов mSUV. По окончании эксперимента для каждой группы были рассчитаны средняя тяжесть EAE, а также средняя кумулятивная и максимальная тя-

жесть протекания ЕАЕ (**Рис. 23В**). Препараты спинного мозга, окрашенные гематоксилин-эозином, были получены для оценки степеней глиоза и демиелинизации (**Рис. 23Г**). Нами было обнаружено, что группа p1 mSUV значительно отличается от группы плацебо (mSUV) как по максимальным, так и по кумулятивным показателям тяжести заболевания, в то время как подобная разница не наблюдалась для группы p2 mSUV или p3 mSUV (**Рис. 23В**). С другой стороны, средние профили оценки тяжести заболевания (**Рис. 23Б**, правая панель) и оценки степени демиелинизации (**Рис. 23Г**) наглядно демонстрируют, что окончательное восстановление в группах p2 mSUV и p3 mSUV было заметно лучше, чем в группе p1 mSUV. Важно отметить, что препарат p123 mSUV значительно снизил тяжесть протекания ЕАЕ, уменьшив как общий профиль тяжести заболевания, так и в итоге обеспечив полное восстановление (**Рис. 23Б**, центральная панель), таким образом, сочетая лечебные свойства отдельных пептидов. Группа p123 mSUV значительно отличалась от группы плацебо по средней максимальной тяжести болезни (**Рис. 23В**, центральная панель) и имела самый низкий средний показатель совокупной тяжести заболевания (14, IQR = 5,25) среди всех тестовых групп (**Рис. 23В**, левая панель). При расчете параметра, характеризующего величину дельты между экспериментальными группами и плацебо (**Рис. 23В**, правая панель), группы расположились в следующем порядке $p1 \ll p2 \text{ mSUV} \approx p3 \text{ mSUV} < p1 \text{ mSUV} \approx \text{Сораконе} < p123 \text{ mSUV}$; В последней группе значение этого параметра было самым высоким (20,3 ед. MDS×день). Глатирамера ацетат (Сораконе), который использовался в качестве положительного контроля, был аналогичен формуляции p123 mSUV в терминах профиля подавления ЕАЕ (**Рис. 23Б**, центральная панель) и средней максимальной тяжести развития ЕАЕ (**Рис. 23В**, центральная панель). Как и ожидалось, введение пептида p1 без липосом не обладало значимым терапевтическим эффектом (**Рис. 23Б**, правая панель, **23В** и **23Г**).

Чтобы прояснить иммунологический статус животных, подвергшихся терапии, мы проанализировали уровень сывороточных аутоантител и провели окрашивание цитокинов в ЦНС (**Рис. 24**). Значительное снижение концентрации аутоантител к полноразмерному МВР по сравнению с контрольной группой наблюдалось только у крыс, получавших p1 mSUV, p123 mSUV и Сораконе (**Рис. 24А**, левая панель). Титр антител к иммунодоминантным фрагментам МВР 81-103 и 146-170 также был снижен в этих группах (**Рис. 24А**, центральная и правая панели). Важно отметить, что пептид МВР₈₁₋₁₀₃ не входил в состав ни одной из композиций липосом, тем не менее концентрация

аутоантител, специфичных к этому фрагменту, снизилась в той же степени, как и анти-MBP антитела.

Окрашивание Th1-цитокинов в спинном мозге крыс, получавших композиции p1 mSUV, p123 mSUV и глатирамера ацетат, показало, что продукция IL-2 и IFN γ была в значительной степени подавлена во всех трех группах (Рис. 24Б), что указывает на противовоспалительный эффект исследуемых композиций. Как следует из результатов проведенных тестов, степень демиелинизации в ЦНС у крыс из этих групп также снижалась. Подавление нейродегенерации коррелировало с усиленным выбросом нейротропного фактора мозга (BDNF), что отчетливо наблюдалось при окраске срезов спинного мозга крыс из различных экспериментальных групп (Рис. 24Б).

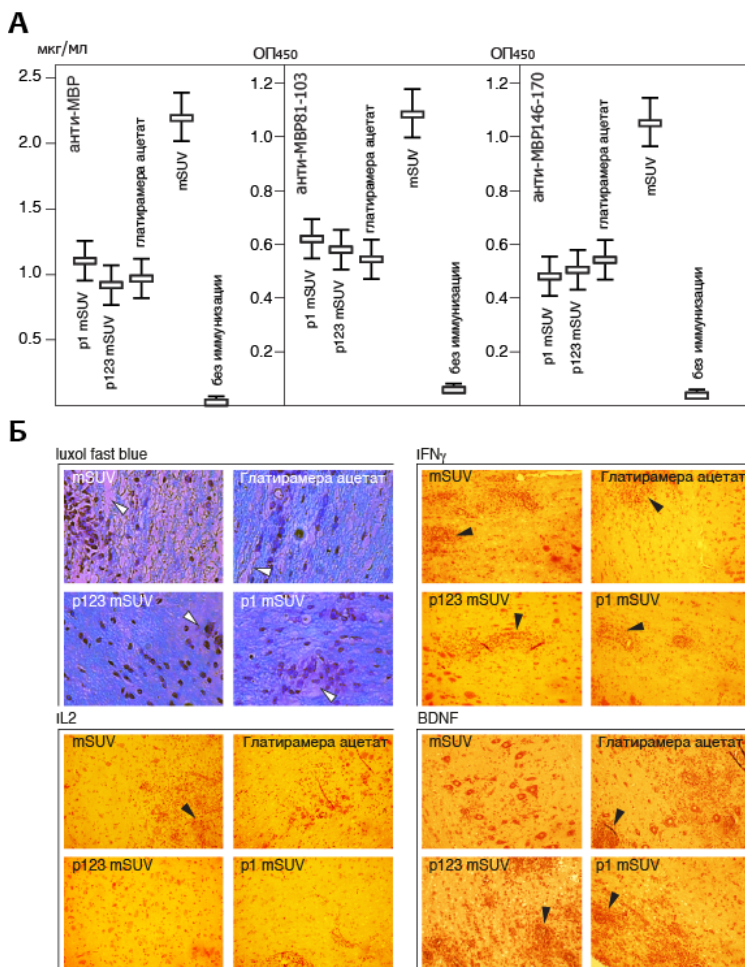


Рис. 24 (А) Сравнение титра сывороточных аутоантител к полноразмерному MBP и его иммунодоминантным фрагментам MBP₈₁₋₁₀₃ и MBP₁₄₆₋₁₇₀ у крыс линии DA с ЕАЕ, подвергнутых терапии, в сравнении животными из контрольной группы с ЕАЕ без лечения и интактными животными. (Б) Гистологические срезы спинного мозга крыс линии DA из групп mSUV, Сорахоне, p1 mSUV и p123 mSUV. Для выявления повреждений миелиновой оболочки аксонов использовали краситель luxol fast blue. Гибридизация срезов с антителами, специфичными к IFN γ , IL-2 и BDNF, для определения цитокинового статуса ЦНС.

Клинические испытания препарата для лечения рассеянного склероза нового поколения Хемус

В период с апреля 2013 года по июль 2014 года 20 пациентов с RR-MS и SP-MS были привлечены к участию в клиническом исследовании композиции p123 mSUV (Хемус), которое проходило в четырех медицинских центрах на территории Российской Федерации. Исследованные дозировки Хемус признаны безопасными и хорошо переносимыми. МРТ-сканирование было проведено для всех пациентов на стартовом этапе (неделя -2) и после лечения на 7, 10 и 18 неделях, используя режимы T1 (с контрастом), T2 (Рис. 25А).

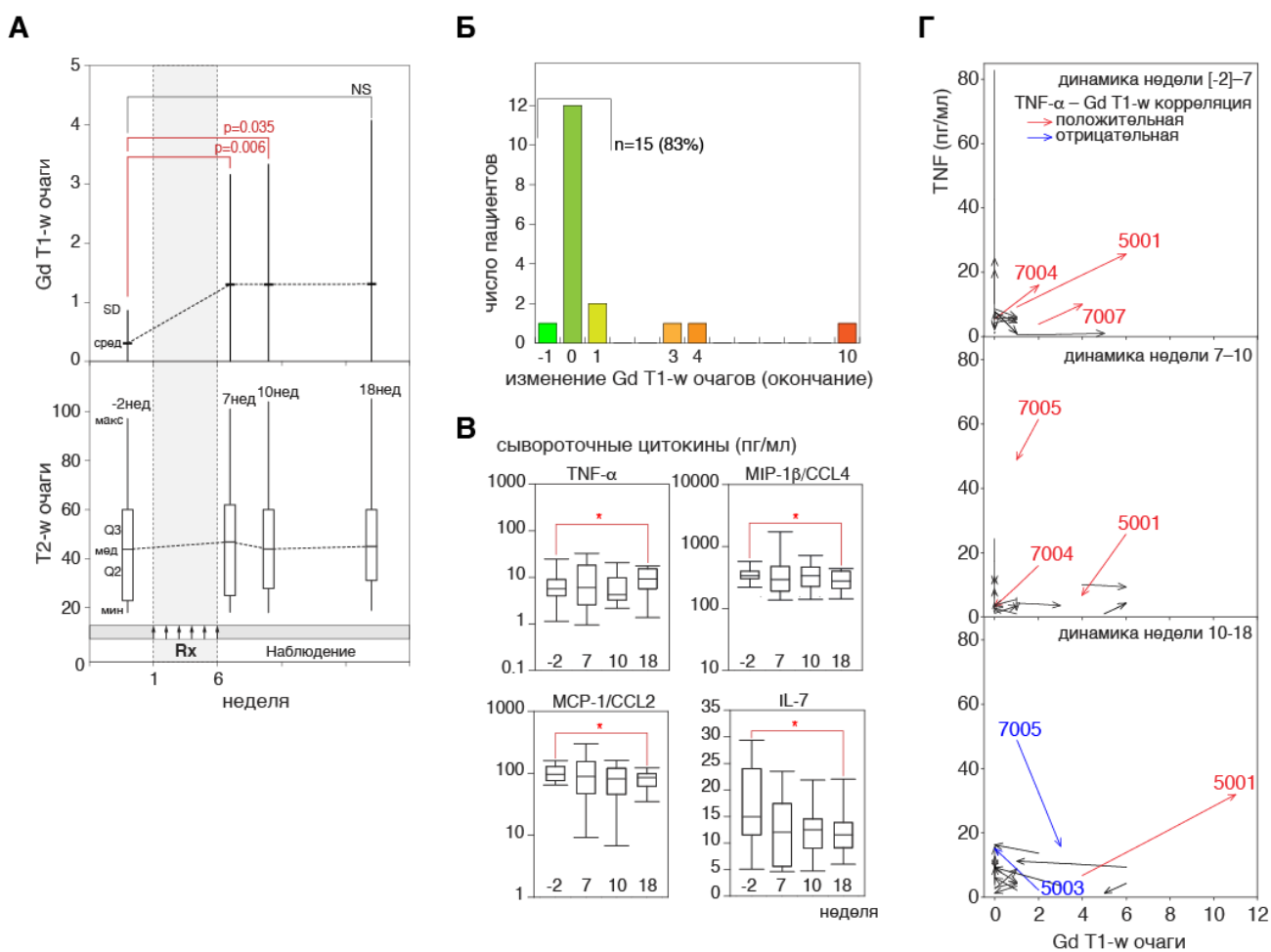


Рис. 25 (А) Бляшки демиелинизации у пациентов по данным МРТ в режиме T1 и T2 по неделям. (Б) Изменение количества активных бляшек на момент окончания исследования. (В) Уровень сывороточных цитокинов по неделям. (Г) Индивидуальная динамика изменения концентрации сывороточного TNF в зависимости от количества активных бляшек демиелинизации.

На исходном этапе у 16 (84%) пациентов не было накапливающих гадолиний бляшек. Однако, к 7-й неделе активные бляшки были обнаружены у 10 (56%) пациентов и, на момент окончания исследования, – у 8 (33,7%) пациентов были активные поражения ЦНС. Несмотря на тенденцию к увеличению числа накапливающих гадолиний бляшек,

пациент-специфический анализ результатов МРТ на момент окончания исследования (**Рис. 25Б**) свидетельствует о том, что у 83% пациентов было от 0 до 1 новых поражений, причем только у 3 пациентов (17%) число активных бляшек увеличилось более чем на одну. Дополнительно нами были проанализированы концентрации 17 сывороточных цитокинов и хемокинов у пациентов, получавших Хемус (**Рис. 25В**). По сравнению с исходным уровнем на момент окончания исследования концентрации MCP-1, MIP-1 и IL-7 были ниже, а TNF - значительно выше (неделя 18). Наблюдалась положительная корреляция между увеличением уровня сывороточного TNF и количеством активных очагов.

Для выяснения влияния пептидов MBP, содержащихся в вакцине Хемус, на плазматоидные дендритные клетки (pDC), мы анализировали экспрессию поверхностных маркеров активации, а также продукцию цитокинов в ответ на инкубацию с GH17 (p1), GK16 (p2) и QR24 (p3). pDC, обработанные каждым из трех пептидов, значительно увеличивали экспрессию HLA-DR, CD80 и CD123 (**Рис. 26**). Примечательно, что было отмечено 5-10-кратное различие в увеличении экспрессии поверхностных маркеров между клетками, изолированными из пациентов с РС и здоровых доноров (ЗД), в то время как пептид QR24 вызывал наиболее выраженное влияние на pDC.

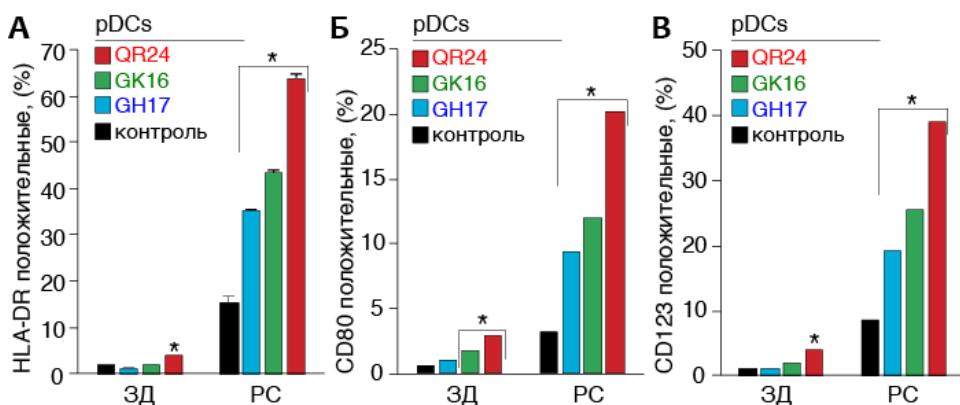


Рис. 26 Определение экспрессии поверхностных маркеров HLA-DR (А), CD80 (Б) и CD123 (В) на поверхности pDC при инкубации с различными пептидами, входящими в состав Хемус.

Профиль продукции цитокинов популяцией pDCs, подвергнутой воздействию пептидов MBP, в общем был аналогичен тому, который ранее наблюдался в случае РВМС (**Рис. 27**). Инкубация с любым из пептидов MBP вызывала ранний выброс (происходящий менее чем за 30 минут) IFN- α культурой pDCs из ЗД, концентрация которого через 6 часов постепенно снижалась. Напротив, только пептид QR24 активировал продукцию IFN- α в pDCs из пациентов с РС, в то время как уровни цитокинов оставались в целом неизменными в случае инкубации с GK16 и GH17.

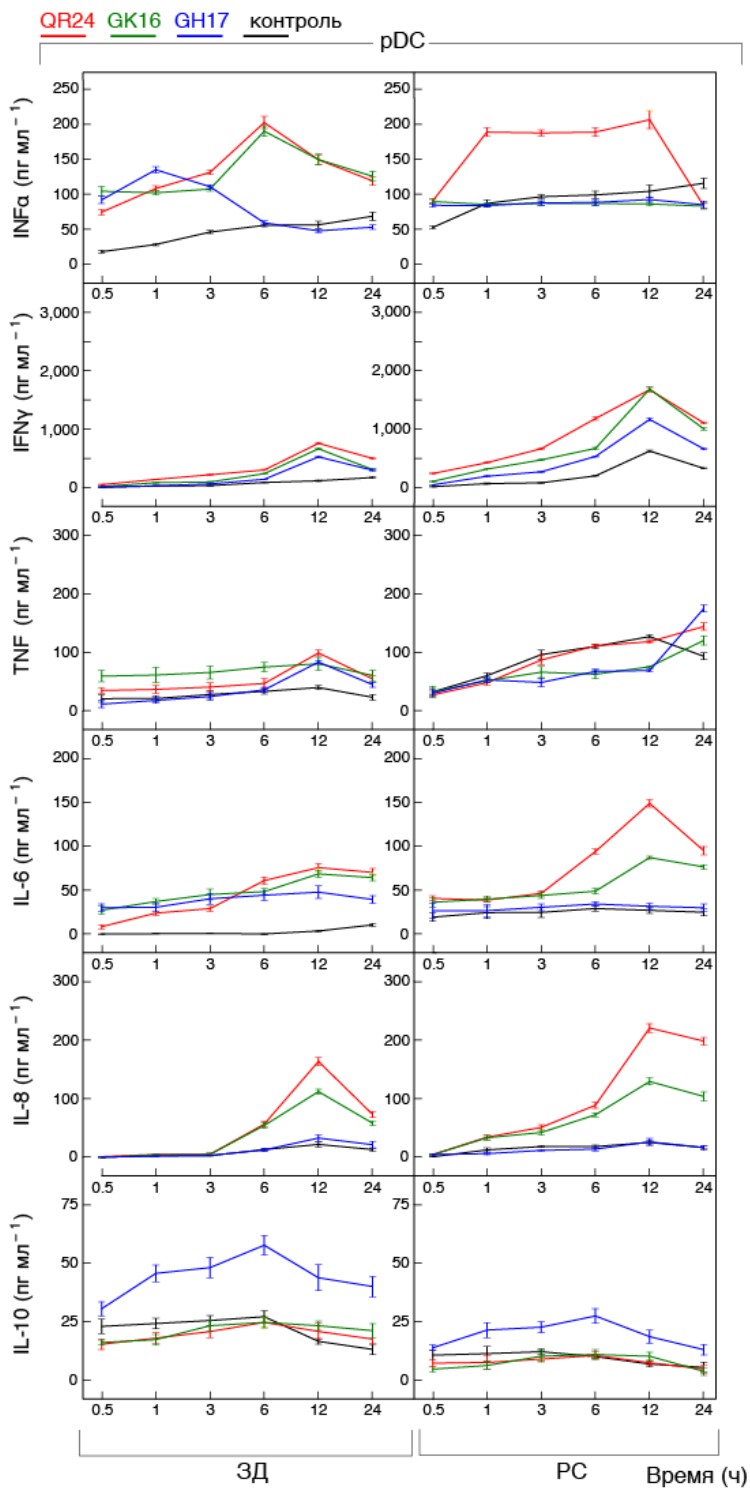


Рис. 27 Анализ экспрессии цитокинов при инкубации pDC с различными пептидами, входящими в состав Xemys.

воздействию GH17, тогда как ни QR24, ни GK16 значимо не влияли на уровень этого цитокина.

Уровень IFN- γ после 12 часов инкубации с каждым из трех пептидов MBP увеличился в 2-3 раза в культуре pDC как из пациентов с РС, так и ЗД. Не было статистически значимого различия в концентрации TNF в культуре pDCs из пациентов с РС, обработанной пептидами MBP, тогда как 2-3 кратное увеличение уровня TNF наблюдалось в культуре pDCs из ЗД, обработанной любым из MBP-пептидов. Уровень IL-6 был увеличен в культуре pDCs из ЗД в ответ на инкубацию с любым из MBP-пептидов, в то время как после 12 часов инкубации только GK16 и QR24 приводили к увеличению концентрации IL-6 в культуре pDC из пациентов с РС в 3-6 раз. Концентрация IL-8 в культуре pDC из ЗД и пациентов с РС возрастала в 10-20 раз при инкубации клеток с GK16 и QR24, но не в случае добавления GH17. Напротив, концентрация IL-10 увеличивалась в культуре pDC, подвергнутых

Изучение низкомолекулярных ингибиторов иммунопротеасомы в качестве средства для терапии аутоиммунной нейродегенерации

Из трех протестированных ингибиторов протеасомы, PS-341 и MG-132 одинаково воздействовали на протеасому, изолированную из головного мозга как здоровых, так и развивающих EAE мышей. В случае β 1i-специфического пептидилэпоксикетона наблюдалось эффективное подавление активности протеасомы из головного мозга мышей линии SJL с EAE, при этом он практически не воздействовал на протеасому из головного мозга мышей линии BALB/c (**Рис. 28А**). Все три протестированных ингибитора существенно замедляли гидролиз MBP протеасомой *in vitro* (**Рис. 28Б**).

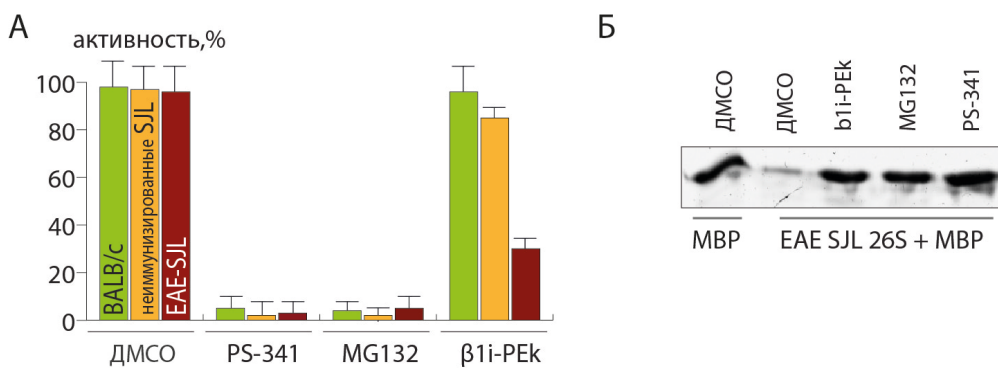


Рис. 28 (А) Химотрипсин-подобная активность протеасомы (в процентах от активности протеасомы, не обработанной ингибиторами) при воздействии 1% ДМСО (контроль), 1 мкМ PS-341, 1 мкМ MG-132 и 1 мкМ β 1i-специфического пептидилэпоксикетона (Б) Воздействие ингибиторов протеасомы на гидролиз MBP *in vitro* 26S протеасомой, изолированной из головного мозга мышей линии SJL, развивающих EAE.

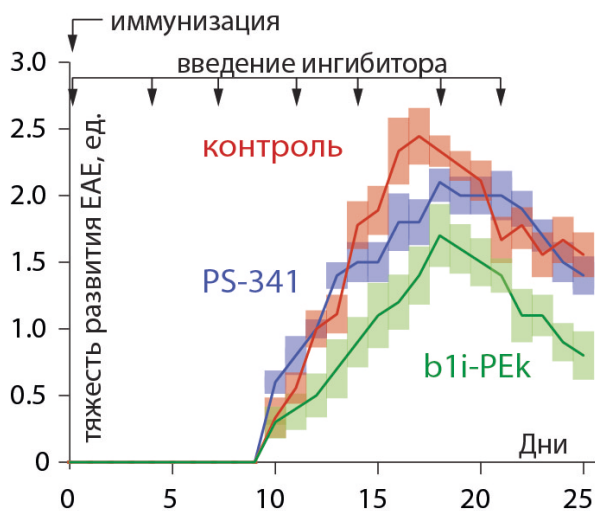


Рис. 29 Развитие EAE у мышей линии SJL без терапии и при введении ингибиторов PS-341 и β 1i-специфического пептидилэпоксикетона в дозе 0,5 мг/кг 2 раза в неделю в течение 21 дня после иммунизации.

Далее нами была протестирована способность ингибиторов PS-341 и β 1i-специфического пептидилэпоксикетона подавлять развитие EAE у мышей линии

SJL. Указанные препараты вводили внутривенно в хвостовую вену 2 раза в неделю с первого по 21й день после иммунизации. Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что β 1i-специфический пептидилэпоксикетон снижает тяжесть протекания заболевания эффективнее, чем PS-341 в той же дозировке (0.5 мг/кг) (**Рис. 29**).

Заключение.

В рамках настоящей работы нами было установлено, что МВР принадлежит к крайне малочисленной группе белков, способных подвергаться протеолизу 26S протеасомой в отсутствие молекул убиквитина.

Поиск структурных элементов, необходимых для убиквитин-независимого гидролиза МВР протеасомой, выявил в составе МВР множественные «композиционные дегроны», инвариантные их линейной последовательности. На основе полученных данных можно утверждать, что механизм убиквитин-независимого гидролиза МВР протеасомой включает в себя заряд-опосредованное взаимодействие множественных положительно заряженных дегронов МВР с отрицательно заряженными мотивами субъединиц протеасомы с последующей транслокацией в протеолитическую камеру коровой 20S субчастицы. Показано, что гидролиз МВР протеасомой АТФ-независим и ускоряется в присутствии регуляторных элементов типа REG альфа и гамма. Путем широкомасштабного транскриптомного анализа зафиксирован повышенный уровень регуляторной субчастицы REG альфа в первичной глиальной культуре при воздействии воспалительного стимула.

Протеасома является главным протеолитическим комплексом, генерирующим пептиды, презентруемые на поверхности клетки в контексте комплексов гистосовместимости I класса. Отсутствие контроля за гидролизом МВР со стороны системы убиквитинилирования означает, что качественный и количественный спектр пептидов МВР, презентруемых на поверхности олигодендроцитов, практически полностью определяется каталитическими субъединицами протеасомы. Нами было установлено, что при развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ) – животной модели рассеянного склероза – в головном мозге иммунизированных животных конститутивная протеасома в значительной степени замещается иммунопротеасомой, при этом иммуносубъединица $\beta 1i$ локализуется преимущественно в олигодендроцитах. Показано, что увеличенное содержание иммунопротеасомы в головном мозге мышей с ЕАЕ приводит к образованию повышенного количества ряда патогенных пептидов МВР, включая пептид ENPVVHFF, являющийся частью энцефалитогенного региона МВР. Активированные CD8⁺ Т-клетки, специфичные к данному пептиду, эффективно лизировали

олигодендрциты, обработанные интерфероном-гамма. Специфический ингибитор иммуносубъединицы $\beta 1i$ селективно воздействовал на иммунопротеасому *in vitro*, а также эффективно подавлял развитие ЕАЕ *in vivo* у экспериментальных животных. Полученные факты указывают на возможную связь между убиквитин-независимой протеолитической активностью иммунопротеасомы в отношении основного белка миелина и развитием рассеянного склероза, а также на перспективность специфических ингибиторов иммунопротеасомы как потенциальных лекарственных средств (Рис. 30).

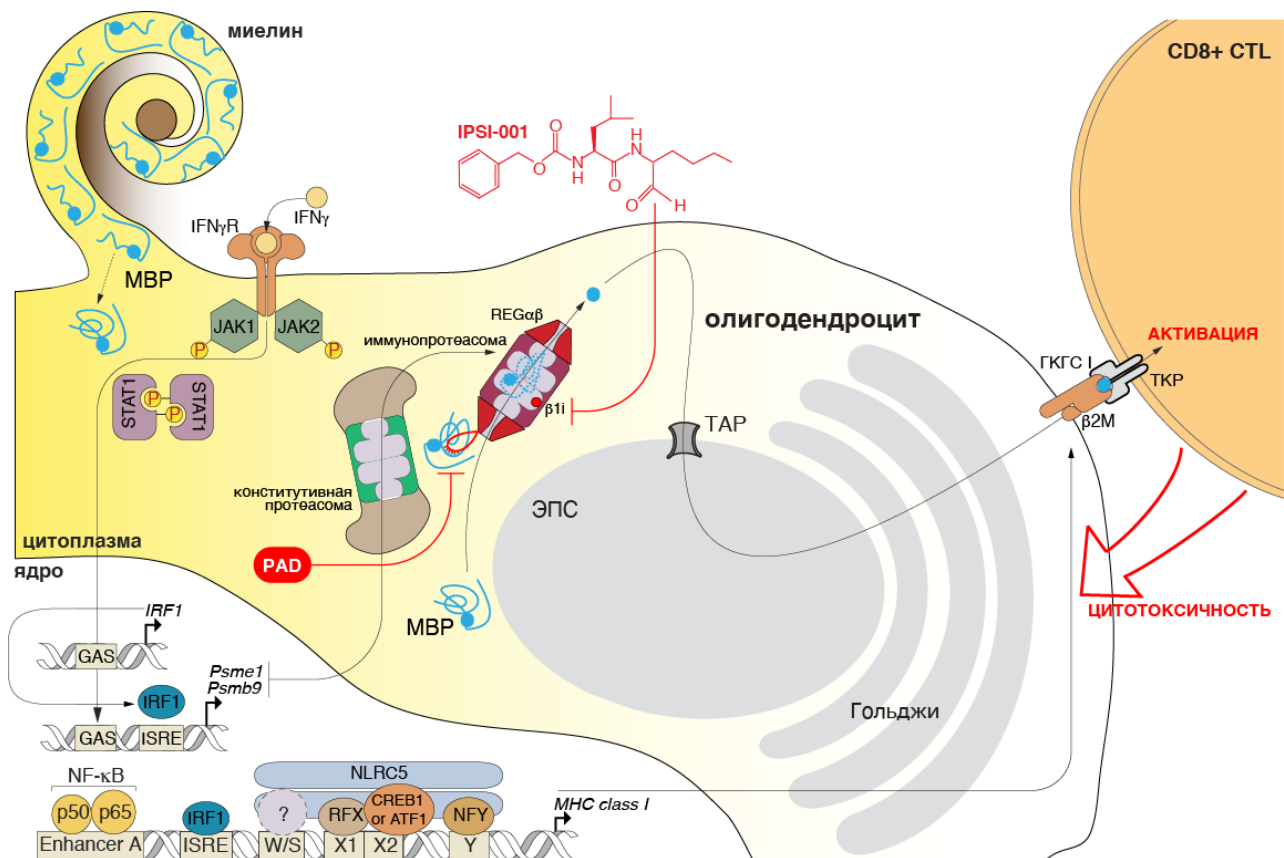


Рис. 30 Роль иммунопротеасомы в развитии аутоиммунной нейродегенерации, а также перспективные способы её направленной терапии.

Анализ репертуаров миелин-реактивных антител может выявить особенности механизма индукции и прогрессии РС. В данной работе с целью расширения репертуара анализируемых аутоантител была создана фаг-дисплейная библиотека одноцепочечных антител на основе лимфоцитов, изолированных из крови пациентов с РС. Антитела, изначально отобранные на способность связывать MBP, оказались высокоомологичны антителам против вирусного белка LMP1 вируса Эпштейн-Барр. Для одного такого антитела способность к взаимодействию с белками MBP и LMP1 была показана *in vitro*, что указывает на наличие природной кросс-реактивности.

Основным выводом из этих экспериментов является то, что антитела против LMP1, образующиеся во время инфекции вирусом Эпштейн-Барр, могут в дальнейшем, связываясь с МВР, выступать в качестве воспалительного триггера (Рис. 31). Проведенное нами широкомасштабное секвенирование библиотек антител, отобранных на миелиновые и вирусные антигены, позволило выявить зародышевые линии, наиболее характерные для кросс-реактивных аутоантител.

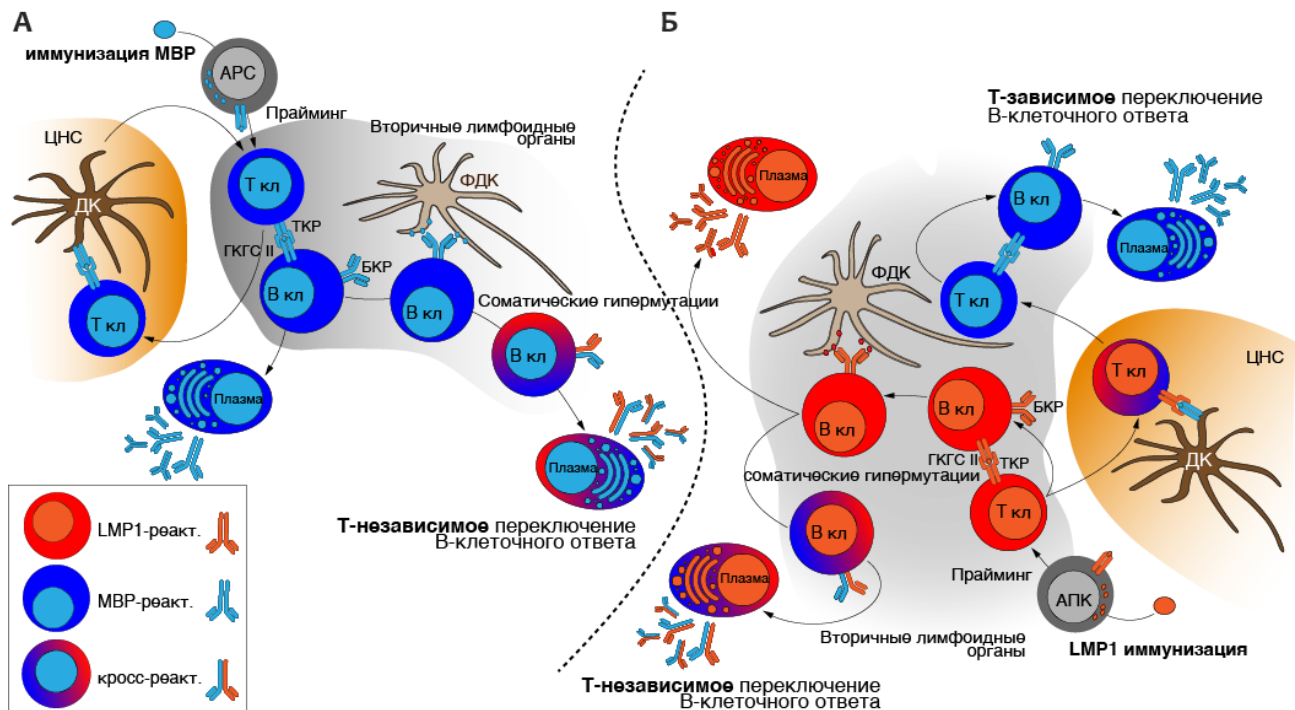


Рис. 31 Схема развития В-клеточного ответа у модельных животных при иммунизации белками МВР и LMP1, которая обосновывает предполагаемый механизм индукции миелин-реактивных аутоантител на фоне хронической инфекции вирусом EBV.

Чтобы выявить наиболее эффективный способ подавления аутореактивных клеток, в данной работе нами был протестирован целый ряд бактериальных токсинов, а также константный фрагмент антитела человека класса G. Результаты свидетельствуют, что РНКаза барназа и константный фрагмент антитела человека класса G являются наиболее перспективными «боеголовками» создаваемых иммунотоксинов. В настоящей работе была показана принципиальная возможность выборочного удаления аутореактивных В-клеток с применением константного фрагмента антитела, слитного с иммунодоминантной последовательностью МВР₈₂₋₁₀₅. Для специфической элиминации MOG-реактивных В-клеток нами были разработаны иммунотоксины на основе каталитических и транслокационных субъединиц дифтерийного токсина (DT), слитного с иммунодоминантной последовательностью MOG.

В данном исследовании нами апробированы подходы к индукции иммунологической толерантности путем введения антигенных детерминант МВР в составе маннозилированных однослойных липосом. Результаты этого исследования показывают, что фрагменты МВР, инкапсулированные в маннозилированные липосомы, эффективно подавляют развитие ЕАЕ у крыс DA, снижая тяжесть первой атаки и существенно облегчая восстановление после стадии обострения. При введении препарата наблюдалось снижение Th1 цитокинов, индукция экспрессии BDNF в ЦНС и ингибирование продукции анти-МВР антител. Детализация механизма действия созданного препарата свидетельствует о его двухстадийности. На первом этапе интернализация фрагментов МВР дендритными клетками приводит к выбросу противовоспалительного цитокина IL-10 и Th2-поляризации, в то время как на втором этапе происходит «перезагрузка» иммунной системы благодаря образованию популяции регуляторных Т-клеток (Рис. 32).

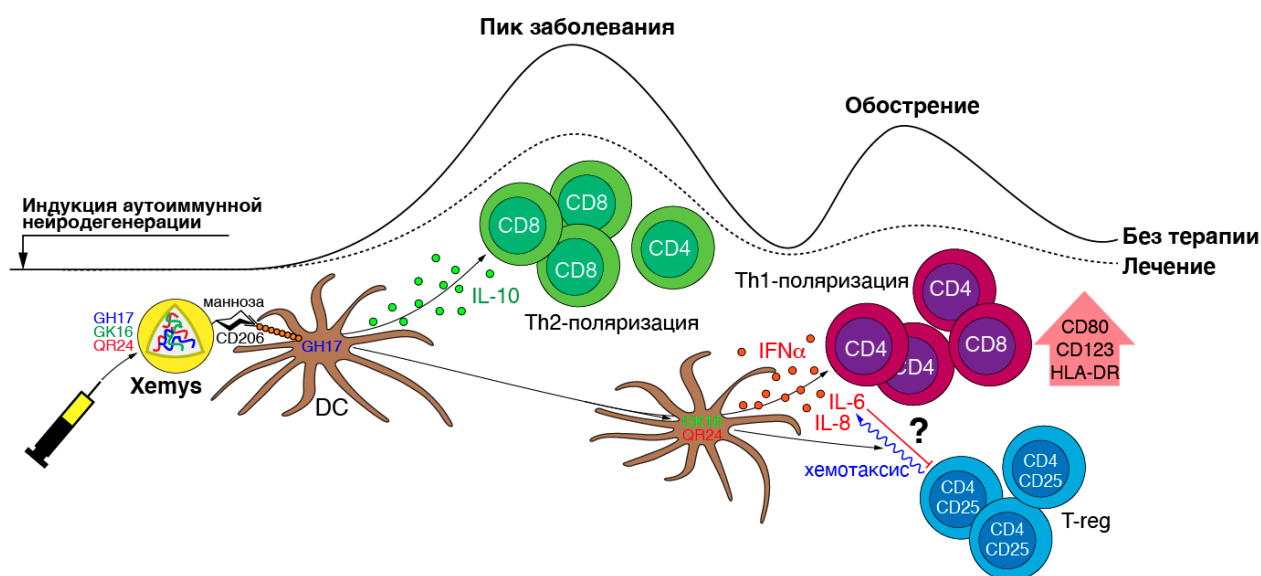


Рис. 32 Молекулярный механизм действия препарата Xemys

Успешно завершённые клинические испытания второй стадии препарата Xemys, созданного на основе данных разработок, показали, что его введение является безопасным и хорошо переносится больными. При введении Xemys наблюдалась стабилизация развития РС у пациентов с ранее некупируемой прогрессией. Имеющиеся данные о профиле цитокинов свидетельствуют, что введение Xemys пациентам с РС приводит к нормализации уровней цитокинов до значений, характерных для условно здоровых индивидов. Таким образом, имеющиеся результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего тестирования Xemys в

качестве препарата нового поколения, изменяющего течение РС.

Накопленные в настоящей работе знания можно суммировать как платформу, объединяющую определение лигандов БКР с использованием рациональных и комбинаторных эпитопных библиотек и методов высокопроизводительного скрининга с дальнейшим созданием на их основе иммунотоксинов для селективной элиминации аутореактивных В-клеток (Рис. 33). Подобная платформа показала свою эффективность и позволила в рамках данной работы проделать путь от простейших экспериментов *in vitro* до успешно проводимых клинических испытаний. В будущем описанная платформа может стать основой для исследования аутоантигенных эпитопов, которые в составе бимодальных токсинов имеют шанс стать высокоспецифичными препаратами в борьбе с аутоиммунными нарушениями.

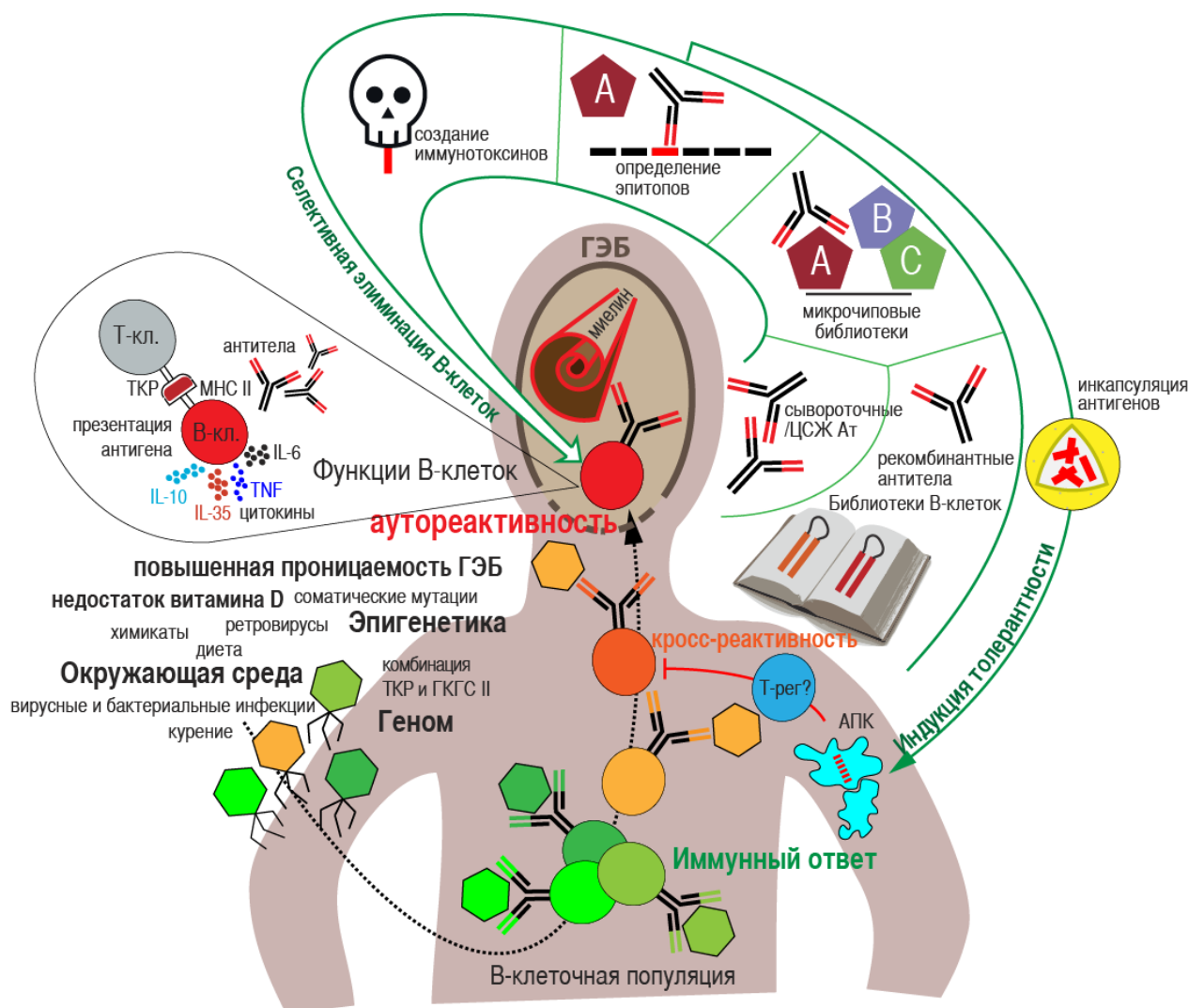


Рис. 33 Концепция молекулярно-иммунобиологической платформы, объединяющей определение лигандов БКР с использованием рациональных и комбинаторных эпитопных библиотек и методов высокопроизводительного скрининга с дальнейшим созданием на их основе иммунотоксинов для селективной элиминации аутореактивных В-клеток.

III. ВЫВОДЫ

1. На структурном уровне изучен репертуар аутореактивных иммуноглобулинов к ряду нейтральных аутоантигенов в сыворотке крови пациентов с рассеянным склерозом, а также модельных животных.
2. Экспериментально подтверждена гипотеза молекулярной мимикрии как одного из вариантов возникновения рассеянного склероза.
3. Впервые продемонстрирован факт убиквитин-независимости внутриклеточной деградации физиологически значимого аутоантигена протеасомой, показана непосредственная связь данного факта с развитием аутоиммунной нейродегенерации.
4. Детализирован молекулярный механизм убиквитин-независимой деградации основного белка миелина протеасомой. Высказана гипотеза об универсальности данного механизма, обуславливающего прямой захват основных полипептидных субстратов регуляторными комплексами протеасомы.
5. Созданы модульные бифункциональные иммунотоксины, позволяющие проводить узконаправленную элиминацию заранее определенных популяций патологических лимфоцитов.
6. Разработаны подходы к индукции толерантности инкапсулированными фрагментами аутоантигенов. Предложенный на их основе препарат Хемус успешно прошел I и II фазы клинических испытаний с имеющимся одобренным синопсисом на фазу III.
7. Продемонстрирована потенциальная возможность блокады каталитических субъединиц иммунопротеасомы в качестве средства для терапии аутоиммунной нейродегенерации.

IV. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Статьи

В иностранных рецензируемых журналах:

1. Exposure to the Epstein-Barr Viral Antigen Latent Membrane Protein 1 Induces Myelin-Reactive Antibodies In Vivo. Lomakin Y, Arapidi GP, Chernov A, Ziganshin R, Tsyganov E, Lyadova I, Butenko IO, Osetrova M, Ponomarenko N, Telegin G, Govorun VM, Gabibov A, **Belogurov A Jr.** *Front Immunol.* 2017 Jul 6;8:777. doi: 10.3389/fimmu.2017.00777
2. Ivanova VV, Khaiboullina SF, Gomzikova MO, Martynova EV, Ferreira AM, Garanina EE, Sakhapov DI, Lomakin YA, Khaibullin TI, Granatov EV, Khabirov FA, Rizvanov AA, Gabibov A, **Belogurov A Jr.** Divergent Immunomodulation Capacity of Individual Myelin Peptides-Components of Liposomal Therapeutic against Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2017 Oct 16;8:1335. doi: 10.3389/fimmu.2017.01335
3. Stepanov A, Lomakin Y, Gabibov A, **Belogurov A.** Peptides against autoimmune neurodegeneration. *Curr Med Chem.* 2017 Jun 4. doi: 10.2174/0929867324666170605092221
4. Kudriaeva A, Galatenko VV, Maltseva DV, Khaustova NA, Kuzina E, Tonevitsky AG, Gabibov A, **Belogurov A.** The Transcriptome of Type I Murine Astrocytes under Interferon-Gamma Exposure and Remyelination Stimulus. (2017) *Molecules.* May 15;22(5). pii: E808. doi: 10.3390/molecules22050808.
5. **Belogurov, A., Jr.,** Zakharov, K., Lomakin, Y., Surkov, K., Avtushenko, S., Kruglyakov, P., Smirnov, I., Makshakov, G., Lockshin, C., Gregoriadis, G., Genkin, D., Gabibov, A., Evdoshenko, E. 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 (2016) *Neurotherapeutics*, 13 (4), pp. 895-904.
6. Lomakin, Y., Shmidt, A., Glagoleva, I., Okunola, J., Vaskina, M., **Belogurov, A.,** Gabibov, A. Myelin-Reactive Monoclonal Antibodies from Multiple Sclerosis Patients Cross-React with Nucleoproteins in HEp-2 Lysate (2016) *BioNanoScience*, 6 (4), pp. 322-324.
7. Stepanov, A., Belyy, A., Kasheverov, I., Rybinets, A., Dronina, M., Dyachenko, I., Murashev, A., Knorre, V., Sakharov, D., Ponomarenko, N., Tsetlin, V., Tonevitsky, A., Deyev, S., **Belogurov, A., Jr,** Gabibov, A. Development of a recombinant immunotoxin for the immunotherapy of autoreactive lymphocytes expressing MOG-specific BCRs (2016) *Biotechnology Letters*, 38 (7), pp. 1173-1180.
8. Ziganshin, R.H., Ivanova, O.M., Lomakin, Y.A., **Belogurov, A.A.,** Kovalchuk, S.I., Azarkin, I.V., Arapidi, G.P., Anikanov, N.A., Shender, V.O., Piradov, M.A., Suponeva, N.A., Vorobyeva, A.A., Gabibov, A.G., Ivanov, V.T., Govorun, V.M. The pathogenesis of the demyelinating form of guillain-barre syndrome (GBS): Proteopeptidomic and immunological profiling of physiological fluids (2016) *Molecular and Cellular Proteomics*, 15 (7), pp. 2366-2378.
9. Gvozdeva, O.V., **Belogurov, A.A., Jr.,** Kuzina, E.S., Gabibov, A.G., Meschaninova, M.I., Ven'yaminova, A.G., Zenkova, M.A., Vlassov, V.V., Chernolovskaya, E.L. Modified siRNA effectively silence inducible immunoproteasome subunits in NSO cells (2016) *Biochimie*, 125, pp. 75-82.
10. Lomakin, Y.*, **Belogurov, A.*,** Glagoleva, I., Stepanov, A., Zakharov, K., Okunola, J., Smirnov, I., Genkin, D., Gabibov, A. Administration of Myelin Basic Protein Peptides Encapsulated in Mannosylated Liposomes Normalizes Level of Serum TNF- α and IL-2 and Chemoattractants CCL2 and CCL4 in Multiple Sclerosis Patients (2016) *Mediators of Inflammation*, 2016, art. no. 2847232 *равный вклад
11. **Belogurov, A., Jr.,** Kuzina, E., Kudriaeva, A., Kononikhin, A., Kovalchuk, S., Surina, Y., Smirnov, I., Lomakin, Y., Bacheva, A., Stepanov, A., Karpova, Y., Lyupina, Y., Kharybin, O., Melamed, D., Ponomarenko, N., Sharova, N., Nikolaev, E., Gabibov, A. Ubiquitin-independent proteosomal degradation of myelin basic protein contributes to development of neurodegenerative autoimmunity (2015) *FASEB Journal*, 29 (5), pp. 1901-1913.
12. Lomakin, Y.A., Zakharova, M.Y., Stepanov, A.V., Dronina, M.A., Smirnov, I.V., Bobik, T.V., Pyrkov, A.Y., Tikunova, N.V., Sharanova, S.N., Boitsov, V.M., Vyazmin, S.Y., Kabilov, M.R., Tupikin, A.E., Krasnov, A.N., Bykova, N.A., Medvedeva, Y.A., Fridman, M.V., Favorov, A.V., Ponomarenko, N.A., Dubina, M.V., Boyko, A.N., Vlassov, V.V., **Belogurov Jr, A.A.,** Gabibov, A.G. Heavy-light chain interrelations of MS-associated immunoglobulins probed by deep sequencing and rational variation (2014) *Molecular Immunology*, 62 (2), pp. 305-314.
13. **Belogurov Jr., A.,** Kudriaeva, A., Kuzina, E., Smirnov, I., Bobik, T., Ponomarenko, N., Kravtsova-Ivantsiv, Y., Ciechanover, A., Gabibov, A. Multiple sclerosis autoantigen myelin basic protein escapes control by ubiquitination during proteasomal degradation (2014) *Journal of Biological Chemistry*, 289 (25), pp. 17758-17766.
14. Kuzina, E., Kudriaeva, A., Smirnov, I., Dubina, M.V., Gabibov, A., **Belogurov, A.** Glatiramer Acetate and Nanny Proteins Restrict Access of the Multiple Sclerosis Autoantigen Myelin Basic Protein to the 26S Proteasome (2014) *BioMed Research International*, 2014, art. no. 926394

15. **Belogurov Jr., A.A.**, Stepanov, A.V., Smirnov, I.V., Melamed, D., Bacon, A., Mamedov, A.E., Boitsov, V.M., Sashchenko, L.P., Ponomarenko, N.A., Sharanova, S.N., Boyko, A.N., Dubina, M.V., Friboulet, A., Genkin, D.D., Gabibov, A.G. Liposome-encapsulated peptides protect against experimental allergic encephalitis (2013) *FASEB Journal*, 27 (1), pp. 222-231.
16. **Belogurov Jr., A.**, Smirnov, I., Ponomarenko, N., Gabibov, A. Antibody-antigen pair probed by combinatorial approach and rational design: Bringing together structural insights, directed evolution, and novel functionality (2012) *FEBS Letters*, 586 (18), pp. 2966-2973.
17. Gabibov, A.G.* **Belogurov Jr., A.A.***, Lomakin, Y.A., Zakharova, M.Y., Avakyan, M.E., Dubrovskaya, V.V., Smirnov, I.V., Ivanov, A.S., Molnar, A.A., Gurtsevitch, V.E., 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 (2011) *FASEB Journal*, 25 (12), pp. 4211-4221.

* **равный вклад**

18. Stepanov, A.V.* **Belogurov Jr., A.A.***, Ponomarenko, N.A., Stremovskiy, O.A., Kozlov, L.V., Bichucher, A.M., Dmitriev, S.E., Smirnov, I.V., Shamborant, O.G., Balabashin, D.S., Sashchenko, L.P., Ton-evitsky, A.G., Friboulet, A., Gabibov, A.G., Deyev, S.M. Design of targeted B cell killing agents (2011) *PLoS ONE*, 6 (6), art. no. e20991 * **равный вклад**
19. **Belogurov Jr., A.A.**, Zargarova, T.A., Turobov, V.I., Novikova, N.I., Favorova, O.O., Ponomarenko, N.A., Gabibov, A.G. Suppression of ongoing experimental allergic encephalomyelitis in da rats by novel peptide drug, structural part of human myelin basic protein 4662(2009) *Autoimmunity*, 42 (4), pp. 362-364.
20. **Belogurov Jr., A.**, Kozyr, A., Ponomarenko, N., Gabibov, A. Catalytic antibodies: Balancing between Dr. Jekyll and Mr. Hyde (2009) *BioEssays*, 31 (11), pp. 1161-1171.

В российских рецензируемых журналах:

21. **Белогуров А.А.**, Иванова О.М., Ломакин Я.А., Зиганшин Р.Х., Васькина М.И., Кнорре В.Д., Климова Е.А., Габибов А.Г., Иванов В.Т., Говорун В.М. Медиаторы и биомаркеры воспаления при менингите: цитокиновое и пептидомное профилирование цереброспинальной жидкости. *Биохимия*. 2016. Т. 81. № 11. С. 1540-1552.
22. Кудряева А.А., Хаустова Н.А., Мальцева Д.В., Кузина Е.С., Глаголева И.С., Сурина Е.А., Кнорре В.Д., **Белогуров А.А.**, Тоневитский А.Г., Габибов А.Г. Экспрессионный профиль мрнк олигодендроцитов мыши в условиях воспаления *Доклады Академии наук*. 2016. Т. 469. № 3. С. 361-365.
23. Кузина Е.С., Кудряева А.А., Глаголева И.С., Кнорре В.Д., Габибов А.Г., **Белогуров А.А.** Деиминирование основного белка миелина замедляет его метаболизм, опосредованный протеосомами. *Доклады Академии наук*. 2016. Т. 469. № 4. С. 496-500.
24. Кузина Е.С., Кудряева А.А., Мальцева Д.В., **Белогуров А.А.** Пептидилальдегид, специфически взаимодействующий с иммуносубъединицей протеасомы $\beta 1i$: эффекты *in vitro* и *in vivo* *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016. Т. 161. № 1. С. 80-83.
25. Степанов А.В., **Белогуров А.А.**, Kothapalli P., Шамборант О.Г., Кнорре В.Д., Телегин Г.Б., Овсепян А.А., Пономаренко Н.А., Деев С.М., Kaveri S.V., Габибов А.Г. Направленная элиминация миелинреактивных в-клеток с применением иммунотоксинов – лигандов антигенных рецепторов. *Acta Naturae*. 2015. Т. 7. № 2 (25). С. 79-85.
26. Кузина Е.С., Черноловская Е.Л., Кудряева А.А., Зенкова М.А., Кнорре В.Д., Сурина Е.А., Пономаренко Н.А., Бобик Т.В., Смирнов И.В., Бачева А.В., **Белогуров А.А.**, Габибов А.Г., Власов В.В. Ускорение внутриклеточного протеолиза основного белка миелина иммунопротеасомой. *Доклады Академии наук*. 2013. Т. 453. № 4. С. 446.
27. Ломакин Я.А., Захарова М.Ю., **Белогуров А.А.**, Быкова Н.А., Дронина М.А., Тупикин А.Е., Кнорре В.Д., Бойко А.Н., Фаворов А.В., Кабилов М.Р., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г. Полиреактивные аутоантитела при рассеянном склерозе: функциональный отбор из фаг-дисплейной библиотеки в сочетании с методом широкомасштабного секвенирования. *Acta Naturae*. 2013. Т. 5. № 4 (19). С. 104-115.
28. Степанов А.В., **Белогуров А.А.**, Мамедов А.Э., Меламед Д., Смирнов И.В., Кузина Е.С., Генкин Д.Д., Бойко А.Н., Шаранова С.Н., Бэкон А., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г. Терапевтический эффект иммунодоминантных пептидов основного белка миелина, инкапсулированных в наноконтейнеры, на развитие экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита в крысах линии DA. *Биоорганическая химия*. 2012. Т. 38. № 3. С. 306.
29. Бачева А.В., **Белогуров А.А.**, Кузина Е.С., Серебрякова М.В., Пономаренко Н.А., Кнорре В.Д., Говорун В.М., Габибов А.Г. Функциональная деградация основного белка миелина. Протеомный подход. *Биоорганическая химия*. 2011. Т. 37. № 1. С. 45-54.

30. **Белогуров А.А.**, Пономаренко Н.А., Говорун В.М., Габибов А.Г., Бачева А.В. Сайт-специфическая деградация основного белка миелина протеасомой. *Доклады Академии наук*. 2009. Т. 425. № 2. С. 251-255.

31. Бачева А.В., **Белогуров А.А.**, Пономаренко Н.А., Кнорре В.Д., Говорун В.М., Серебрякова М.В., Габибов А.Г. Анализ фрагментации основного белка миелина под действием протеасомы. *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. № 1. С. 84-87.

Монографии:

Нейродегенеративные заболевания. Фундаментальные и прикладные аспекты. Часть III. Рассеянный склероз стр. 382-442 (Габибов А.Г., Фаворова О.О., Кулакова О.Г., Бойко А.Н., **Белогуров А.А.**, Пономаренко Н.А., Гусев Е.И.) Москва, Наука, 2010 г. ISBN 978-5-02-036710-4

Патенты:

1. Composition for treatment of multiple sclerosis Belogurov A.A., Ponomarenko N.A., Gabibov A.G. WO/2011/046462 PCT/RU2009/000533 21.04.2011

2. Liposomes containing oligopeptide fragments of myelin basic protein, a pharmaceutical composition and a method for treatment of multiple sclerosis Avtushenko S.S., Surkov K.G., Romanov V.D., Genkin D.D., Gabibov A.G., Belogurov A.A., Ponomarenko N.A. WO/2011/065867 PCT/RU2010/000710 03.06.2011

3. Липосомы, содержащие олигопептиды - фрагменты основного белка миелина, фармацевтическая композиция и способ лечения рассеянного склероза. Автушенко С.С., Сурков К.Г., Романов В.Д., Генкин Д.Д., Габибов А.Г., Белогуров А.А., Пономаренко Н.А. патент на изобретение RUS 2448685 30.11.2009

4. Инъекционная лекарственная форма олигопептидного препарата для лечения рассеянного склероза и способ ее получения. Романов В.Д., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г., Генкин Д.Д., Белогуров А.А., Автушенко С.С., Сурков К.Г. патент на изобретение RU 2561582

Опубликованные тезисы конференций и доклады:

1. Белогуров А.А. / Специфическая В-клеточная терапия при рассеянном склерозе // 13-я Международная пушинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (Конкурс «УМНИК»), 1 октября 2009 г., Пущино, Российская Федерация. Устный доклад

2. Белогуров А.А. / Специфическая В-клеточная терапия при рассеянном склерозе // Форум ПушИНО-2010, 1 декабря 2010 г., Пущино, Российская Федерация. Устный доклад

3. Белогуров А.А. / Новые подходы к диагностике и терапии рассеянного склероза // Постгеном-2012. Казань 21-24 ноября 2012 Устный доклад

4. Belogurov A.A. / Myelin basic protein epitope library: path to diagnostics and treatment of multiple sclerosis // Second EFIS/EJI Belgrade Symposium Inflammation at the interface of Innate and Acquired Immunity, September 7-10, 2008, Belgrade, Serbia. Приглашенный устный доклад

5. Belogurov A.A. / Myelin basic protein peptides as potential diagnostics and treatment of multiple sclerosis // Oral presentation. Biopharma-2009 - From science to industry, May 25-27, 2009, Antalya, Turkey. Устный доклад

6. Alexey A. Belogurov / Myelin basic protein epitope library: path to diagnostics and treatment of multiple sclerosis // Biocatalysis 2009: Fundamentals & Applications, June 19-24, 2009, Arkhangelsk, Russian Federation. Устный доклад

7. Belogurov A.A. Jr / Novel approaches to treat Multiple Sclerosis // Biopharma-2010 From science to industry, May 17 – 20, 2010 Erevan, Armenia. Устный доклад

8. Belogurov AA Jr, Gabibov AG. / Enhanced release of Myelin Basic Protein encephalitogenic peptide by brain-derived proteasome in autoimmune demyelination // III International Meeting "Early events in Human Pathologies" 29 May - 1 June 2010, Barbizon, France. Устный доклад

9. Белогуров А.А. / Каталитические антитела как основа для новых лекарственных препаратов. // Школа-конференция молодых ученых "Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины-2010" 16-17 сентября 2010 г., Москва, РФ Устный доклад

10. Белогуров А.А. / Иммунопротеасома как мишень для направленного действия низкомолекулярных ингибиторов в новой стратегии лечения аутоиммунных патологий // Первая международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» 17-19 ноября 2010 г., Москва, Российская Федерация. Устный доклад

11. Белогуров А.А., Габибов А.Г. / Деградация и презентация основного белка миелина при аутоиммунных патологиях // X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова. Москва, 14-17 ноября 2011 г. Устный доклад
12. Belogurov A. Jr., Ciechanover A., Gabibov A. / Ubiquitination is not required for proteasome-mediated degradation of myelin basic protein // FEBS 2013, 6-11 July 2013 Устный доклад
13. Белогуров АА / Новые стратегии лечения аутоиммунных патологий на примере рассеянного склероза // Летняя научная школа «Биотехнологии будущего 2013»: 4–9 августа 2013 г., пансионат Голицыно, МО. Пленарная лекция
14. Belogurov A. / Ubiquitin-independent proteasome-mediated proteolysis of myelin basic protein and its role in health and disease // International conference on bioorganic chemistry, biotechnology and bionanotechnology dedicated to the 55th Anniversary of the M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences and the 80th Anniversary of Professor Yuri Ovchinnikov, Москва, 15-19 сентября 2014 Устный доклад
15. Alexey Belogurov Jr. / Molecular approaches to treat Multiple sclerosis // A Russian-German Hirnliga Symposium on: "Molecular mechanisms of neurodegeneration", г. Берлин, Германия, 3-5 мая 2014 Устный доклад
16. Белогуров А.А., Габибов А.Г. / Ubiquitin-independent proteasome-mediated proteolysis of myelin basic protein and its role in health and disease // IV международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», г. Казань, Республика Татарстан, Россия, 29.10-01.11 2014 Приглашенный доклад
17. А.А. Белогуров, А.Г. Габибов / Прямой захват основного белка миелина 19S регуляторной субчастицей в обход системы убиквитинирования обуславливает патологическую значимость миелин-реактивных цитотоксических лимфоцитов при рассеянном склерозе // II Всероссийская конференция «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет» г. Санкт-Петербург, 20-22 октября 2015 Приглашенный доклад
18. А.А. Белогуров / Убиквитин-независимый протеолиз основного белка миелина протеасомой и его роль в норме и патологии // XXVII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» г. Москва, 9-12 февраля 2015 г. Приглашенный доклад
19. Белогуров А.А. / Механизм убиквитин-независимого протеолиза основного белка миелина протеасомой и его связь с развитием аутоиммунной нейродегенерации. // V молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН 18–21 сентября 2016 г., Санкт-Петербург. Приглашенный доклад.
20. А.А. Белогуров, А.Г. Габибов. / Физиологическая значимость убиквитин-независимой дегградации основного белка миелина в развитии аутоиммунной нейродегенерации. // V съезд биохимиков России, Дагомыс, 4–8 октября 2016. Приглашенный доклад.
21. А.А. Белогуров / Разрушать, чтобы жить: круговорот убиквитина // XXIX Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" Москва, 7-10 февраля 2017 г. Пленарный доклад
22. Белогуров А.А. / Разрушать, чтобы жить // Городская открытая научно-практическая конференция «Наука для жизни» Москва, 18 апреля 2017 г., Президиум РАН Приглашенный доклад
23. Белогуров А. / Разрушать, чтобы жить: особенности круговорота убиквитина в динамике. // II Всероссийская конференция с международным участием "Высокопроизводительное секвенирование в геномике" Новосибирск, 18-23 июня 2017 г. Приглашенный доклад
24. Белогуров А.А. / Механизм убиквитин-независимого протеолиза основного белка миелина протеасомой и его связь с развитием аутоиммунной нейродегенерации. // Объединенный научный форум Международная научная конференция "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды" 18-22 сентября 2017 г. Москва. Пленарный доклад
25. Белогуров А.А. / Подходы к направленной терапии аутоиммунной нейродегенерации // II междисциплинарная научная конференция «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» Москва, 11-13 октября 2017 года Приглашенный доклад
26. Alexey Belogurov Jr. / Immunoproteasomes equipped by REGa/b heptamers coordinate autoimmune attack on the myelin sheaths ab intra. // Первый Российско-Корейский день науки и технологии. Москва, 5-6 июня 2017. Приглашенный доклад
27. А.А. Белогуров / Подходы к направленной терапии аутоиммунной нейродегенерации // XXX зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" Москва, 12-15 февраля 2018 г Пленарный доклад

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФ 14-14-00585