

*На правах рукописи*

**Ишина Ирина Андреевна**

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

1.5.3 Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2025

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

**Научный руководитель:**

**Захарова Мария Юрьевна**, кандидат биологических наук

**Официальные оппоненты:**

**Зверева Мария Эмильевна**, д.х.н., профессор кафедры химии природных соединений химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»;

**Кофиади Илья Андреевич**, д.б.н., заведующий лабораторией молекулярной иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства.

**Ведущая организация:**

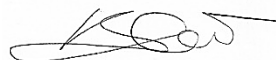
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук.

Защита состоится «21» мая 2025 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при ГНЦ ИБХ РАН по адресу: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 года.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор физико-математических наук Олейников В.А.



## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследования**

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

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

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

Таким образом, для успешного применения персонифицированных методов лечения в клинической практике

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

### **Цель работы и поставленные задачи**

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

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

1. Выявление новых аутоантигенов, связывающихся с продуктами аллелей риска HLA-II, включая HLA-DRB1\*01:01 (DR1) и HLA-DRB1\*04:01 (DR4) при РА, а также HLA-DRB1\*15:01 (DR15) при СКВ, с использованием методов фагового дисплея (для РА и СКВ) и масс-спектрометрии (для РА).
2. Оценка характеристик связывания идентифицированных аутоантигенных пептидов с молекулами HLA-II *in vitro*.
3. Анализ провоспалительного CD4<sup>+</sup> Т-клеточного ответа при взаимодействии с выявленными комплексами пептид-МНС-II (pMHC) при РА.
4. Разработка оптимизированной методики антиген-специфической экспансии CD4<sup>+</sup> Т-клеток для определения последовательностей TCR, взаимодействующих с идентифицированными комплексами pMHC при СКВ.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

В ходе проведенного исследования с использованием фаговой библиотеки, включающей 11973 аутоантигенных пептида, методом фагового дисплея были выявлены новые аутоантигенные пептиды, представляемые на молекулах HLA-II аллелей риска при РА (HLA-DRB1\*01:01, HLA-DRB1\*04:01) и СКВ (HLA-DRB1\*15:01). Некоторые из идентифицированных пептидов обнаружены в иммунопептидоме HLA-II дендритных клеток (ДК), полученных из моноцитов пациентов с РА – носителей аллелей риска HLA-DRB1\*01:01 или HLA-DRB1\*04:01. Выявлен аутореактивный CD4<sup>+</sup> Т-клеточный ответ при взаимодействии с новым аутоантигенным пептидом ANX11<sub>387-401</sub> в комплексе с HLA-DRB1\*01:01. Разработана и оптимизирована система антиген-специфической экспансии CD4<sup>+</sup> Т-

клеток на основе внеклеточных везикул (EVs), что позволило определить последовательности TCR, взаимодействующих с новым аутоантигеном INSR<sub>1297-1311</sub> в комплексе с HLA-DRB1\*15:01 при СКВ. Полученные данные о новых аутоантигенных пептидах, ассоциированных с РА и СКВ, могут быть использованы для разработки новых диагностических маркеров и углубленного изучения аутореактивных Т-клеточных клонов, взаимодействующих с этими антигенами. Дальнейшее исследование механизмов Т-клеточного ответа открывает перспективы для создания таргетных терапевтических стратегий, направленных на модуляцию иммунного ответа при РА и СКВ.

### **Методы исследования**

В данной работе использованы современные чувствительные молекулярно-биологические, биохимические и иммунологические методы исследования, обеспечивающие достоверные и воспроизводимые результаты. Статистическая обработка данных выполнена с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0. Для анализа данных использовался t-критерий Стьюдента, Уэлча или Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0.05$ . Обозначения: ns –  $p \geq 0.05$ , \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ , \*\*\*\* –  $p < 0.0001$ .

### **Положения, выносимые на защиту**

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

### **Степень достоверности результатов**

Достоверность и воспроизводимость полученных результатов подтверждаются использованием современных методологических подходов, а также применением адекватных методов статистической обработки данных

### **Апробация работы**

По материалам диссертации опубликовано 5 оригинальных статей в рецензируемых зарубежных и отечественном журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России.

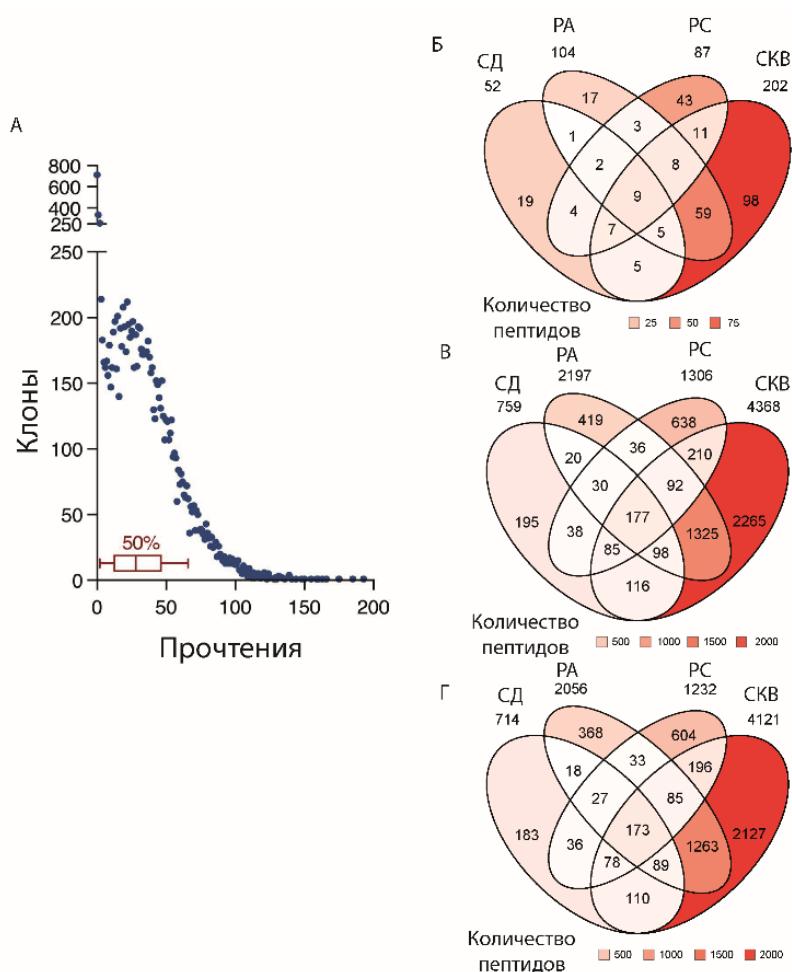
### **Структура и объем диссертации**

Текст диссертации изложен на 147 страницах, содержит 36 рисунков и 11 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов, сокращений, списка литературы, включающего 201 источник, и приложений.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Состав аутоантигенной библиотека пептидов

Поиск новых аутоантигенных пептидов, способных связываться с положительно ассоциированными с АЗ аллелями HLA-II, актуален для разработки новых терапевтических подходов к лечению этих заболеваний. В этой связи в лаборатории биокатализа ГНЦ ИБХ РАН ранее была создана фаговая библиотека, содержащая фрагменты аутоантигенных белков человека, ассоциированных с различными аутоиммунными патологиями и процессами протеасомной деградации. Аутоантигенные белки, отобранные для создания библиотеки, могут вызывать гуморальный иммунный ответ при различных АЗ, согласно ранее опубликованным данным (AAgAtlas – <http://biokb.ncpsb.org/aagatlas>). Наибольшую часть библиотеки, ассоциированную с АЗ, составляли фрагменты аутоантигенных белков, ассоциированных с сахарным диабетом (СД), РА, рассеянным склерозом (РС) и СКВ. При проверке представленности исходной синтетической олигонуклеотидной библиотеки с помощью секвенирования нового поколения (NGS) было детектировано 94% пептидов от общего теоретического числа (Рисунок 1А).



**Рисунок 1. Состав библиотеки аутоантигенов.** (А) Анализ распределения прочтений среди клонов полученной синтетической библиотеки с помощью NGS секвенирования. (Б) Распределение аутоантигенных белков, ассоциированных с СД, РА, РС и СКВ, в теоретической библиотеке. (В) Распределение аутоантигенных пептидов, соответствующих белкам, ассоциированных с СД, РА, РС и СКВ, в теоретической библиотеке. (Г) Распределение аутоантигенных пептидов синтезированной библиотеки ДНК.

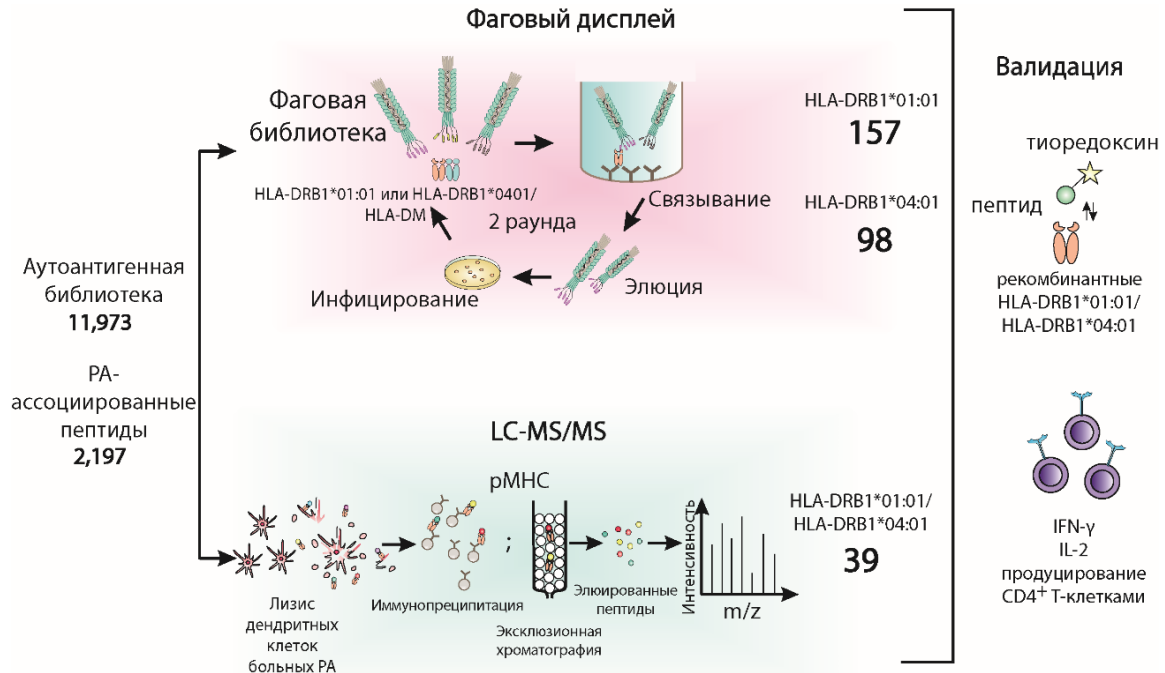
Для поиска аутоантигенных пептидов были выбраны 104 и 202 аутоантигенных белка, для которых ранее был задокументирован гуморальный иммунный ответ при РА и СКВ, соответственно (Рисунок 1Б). Основная концепция использования такой библиотеки для поиска аутоантигенных пептидов HLA-II заключалась в выявлении новых аутоиммунных эпитопов для CD4<sup>+</sup> Т-клеток среди известных потенциальных эпитопов В-клеток. Полученная аутоантигенная библиотека представляла собой 11973 пептида длиной 44 аминокислотных остатка (ак) с перекрытием в 14 ак, включая 2197 и 4368 пептидов, связанных с развитием РА и СКВ, соответственно (Рисунок 1В). Данные секвенирования показали, что 2056 пептидов для РА и 4121 пептид для СКВ были представлены в синтезированной аутоантигенной библиотеке (Рисунок 1Г). С использованием данной синтетической олигонуклеотидной библиотеки была создана библиотека конструкций на основе фагового вектора fADL-1e, которую далее использовали для фаговых отборов на молекулы HLA-DR.

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

Для поиска новых аутоантигенных пептидов, ассоциированных с РА, были выбраны два РА-ассоциированных аллеля – HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01. Экспериментальный процесс поиска этих пептидов можно разделить на два основных этапа: (i) фаговый отбор и (ii) оценка презентации РА-ассоциированных аутоантигенных пептидов на ДК, полученных из моноцитов пациентов с РА, несущих данные аллели. Поскольку разные последовательности из аутоантигенной библиотеки могут с разной эффективностью продуцироваться в составе бактериофагов, для повышения надежности идентификации пептидов, связывающихся с HLA-DR, был предложен двойной подход, сочетающий скрининг фаговой аутоантигенной библиотеки с прямой идентификацией потенциально аутоантигенных пептидов в иммунопептидоме HLA-DR больных РА. На дальнейшем этапе валидации отобранные пептиды были протестированы на связывание с рекомбинантными молекулами HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01 *in vitro*, а также была оценена их способность индуцировать провоспалительный CD4<sup>+</sup> Т-клеточный ответ у пациентов с РА (Рисунок 2). Дополнительно эффективность фагового



отбора оценивалась с использованием программы NetMHCIIpan 4.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCIIpan-4.0>), которая рассчитывает теоретическую аффинность пептидов к определенным аллелям HLA-II.



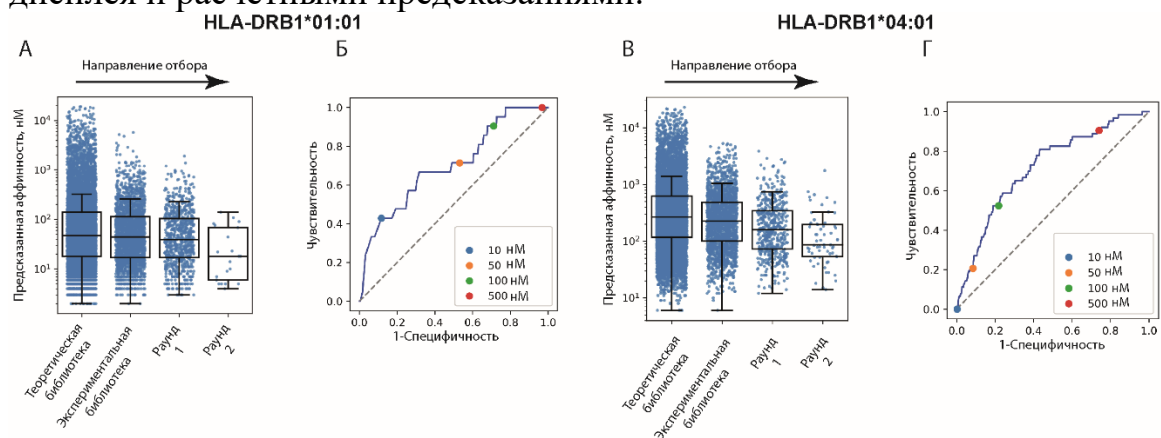
**Рисунок 2. Идентификация РА-ассоциированных антигенных пептидов, презентированных на HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01 с помощью анализа данных скрининга аутоантигенной фаговой библиотеки и масс-спектрометрии иммунопептидома HLA-DR.** Отбор антигенных пептидов проводился параллельно с помощью фагового дисплея аутоантигенной библиотеки и анализа иммунопептидома HLA-DR ДК, полученных из моноцитов больных РА и HDs, положительно генотипированных по HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01. Иммунопептидом HLA-DR был проанализирован с помощью LC-MS/MS. Отобранные РА-ассоциированные аутоантигенные пептиды впоследствии были получены в рекомбинантной форме, и их связывание с HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01 было подтверждено индивидуально *in vitro*. Была оценена способность найденных пептидов связывать и активировать CD4<sup>+</sup> Т-клетки в составе HLA-DR. LC-MS/MS – метод жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии.

Было проведено два раунда фагового отбора с использованием аутоантигенной библиотеки и рекомбинантных белков HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01. Шаперон HLA-DM использовали как природный катализатор загрузки антигенных пептидов на пептид-связывающую борозду молекул HLA-DR. В качестве контроля были проведены два идентичных раунда отбора, в которых отсутствовал белок HLA-DR при сохранении тех же условий. Последовательности элюированных аутоантигенных пептидов были определены после каждого этапа фагового дисплея с помощью NGS. Анализировались данные как из исходной библиотеки, так и после каждого раунда селекции на HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01, а также из соответствующих контрольных раундов. Начиная с исходной

библиотеки, содержащей 11973 пептида, разнообразие лигандов снизилось до 770 пептидов (первый раунд) и 21 последовательности (второй раунд) для HLA-DRB1\*01:01, и до 450 пептидов (первый раунд) и 63 последовательностей (второй раунд) для HLA-DRB1\*04:01 после вычитания пептидов, обнаруженных в отрицательных контрольных отборах.

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

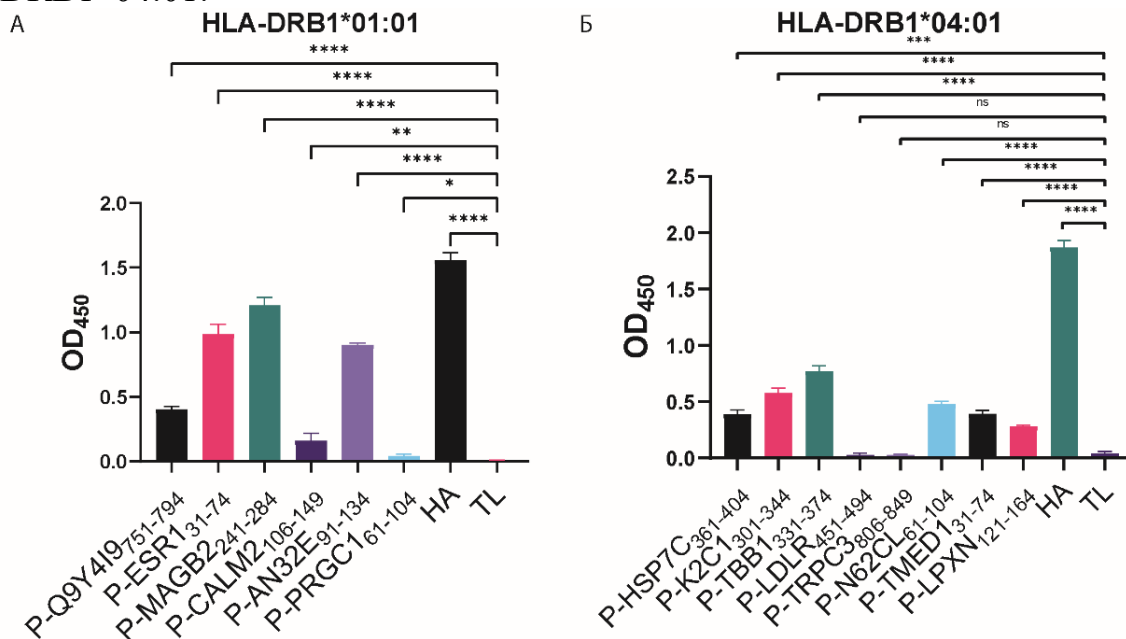
Мы определяли расчётную аффинность связывания с HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01 для репертуаров пептидов в исходной библиотеке и после раундов селекции с помощью программы NetMHCIIpan. Результаты фаговых отборов и виртуальных предсказаний показали статистически значимое сходство. В частности, предсказанная аффинность связывания для пептидов, отобранных после второго раунда, была в среднем выше, чем для остальных пептидов ( $p < 0,002$ , Рисунок 3А, 3В). Для дальнейшего анализа мы использовали пороговое значение аффинности связывания, например 50 нМ, чтобы выделить два репертуара пептидов: высокоаффинные (с аффинностью выше порогового значения) и низкоаффинные (с аффинностью ниже порогового значения). Это позволило рассчитать чувствительность (доля высокоаффинных пептидов среди пептидов после двух раундов отбора) и специфичность (доля низкоаффинных пептидов, исключённых после второго раунда отбора). Далее, предсказанные пороговые значения аффинности связывания были нанесены на график с полученными значениями чувствительности и специфичности (ROC) (Рисунок 3Б, 3Г). Площади под кривыми ROC (AUC) для HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01 составляли 0,7 и 0,72 соответственно, что указывает на умеренную и значительную степень соответствия между экспериментальными результатами фагового дисплея и расчётными предсказаниями.



**Рисунок 3. Определение эффективности фаговых отборов с помощью NetMHCIIpan.** А, Б: Прогнозируемая аффинность лигандов достоверно ( $p < 0,002$ ) снижается при отборе в ряду от исходной теоретической библиотеки ко второму раунду отбора: (А) – HLA-DRB1\*01:01, (В) – HLA-DRB1\*04:01. Б, Г: ROC-кривые

для лигандов, не прошедших ни одного отбора, против прошедших второй отбор: (Б) - HLA-DRB1\*01:01, (Г) - HLA-DRB1\*04:01. Цветными точками дополнительно отмечены часто используемые пороговые значения (10, 50, 100, 500 нМ).

Затем мы выбрали некоторые аутоантигенные пептиды для проверки их связывания с соответствующими HLA-DR *in vitro*. Аутоантигенные пептиды были выбраны на основе процента обогащения по результатам NGS во втором раунде отбора на HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01, а также на основе их отсутствия во втором раунде контрольного отбора. В результате были отобраны шесть таких антигенных пептидов для HLA-DRB1\*01:01 и восемь пептидов для HLA-DRB1\*04:01. Эти пептиды были получены в виде рекомбинантных trx-пептидов, несущих 44 ак пептида и тиоредоксин (trx) в качестве белка-носителя. Большинство из исследуемых trx-пептидов продемонстрировали статистически значимое связывание с молекулами HLA-DRB1\*01:01 (Рисунок 4А) или HLA-DRB1\*04:01 (Рисунок 4Б) после ночной инкубации. Полученные результаты подтверждают эффективность фагового отбора пептидов из аутоантигенной библиотеки для HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01.



**Рисунок 4. Проверка связывания отдельных пептидов, полученных фаговым отбором.** (А) Рекомбинантный HLA-DRB1\*01:01 или (Б) HLA-DRB1\*04:01 (150 нМ) инкубировали в течение 16–18 часов с биотинилированными рекомбинантными trx-пептидами (750 нМ), обогащенными в фаговом дисплее. Тrx-НА (фрагмент гемагглютинаина вируса гриппа А) использовался в качестве положительного контроля, TL (trx без пептида) в качестве отрицательного. Р (phage) – пептиды, отобранные в фаговом отборе.

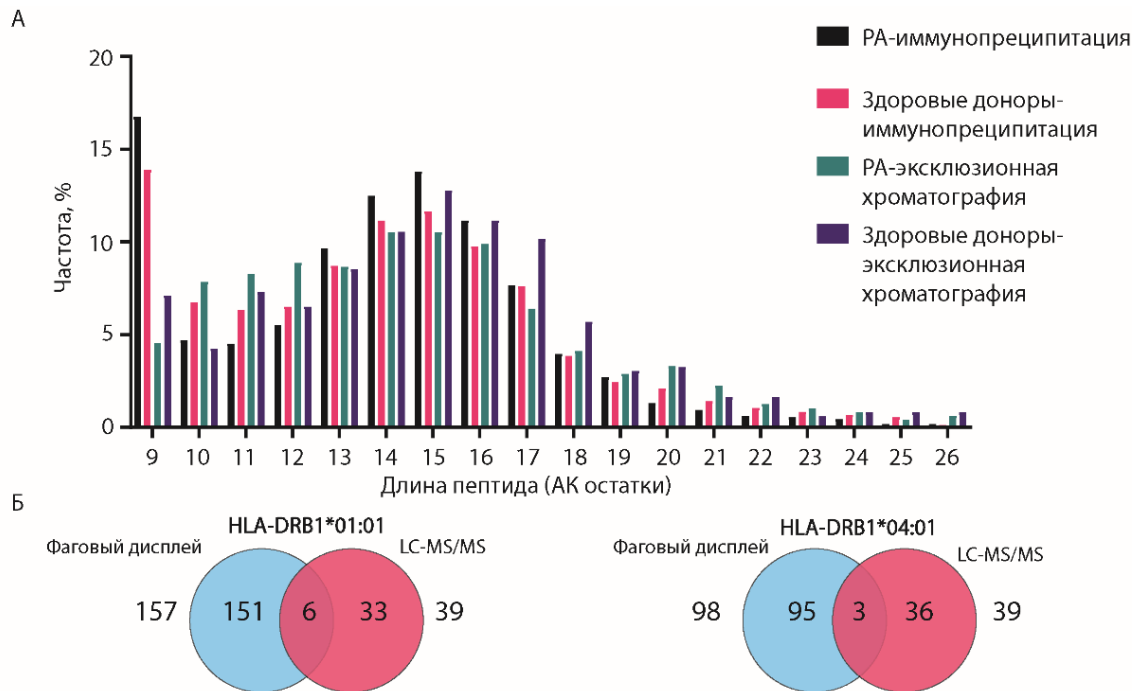
**Ряд аутоантигенных пептидов, идентифицированных с использованием фагового отбора, обнаружен на HLA-DR дендритных клеток доноров с РА**

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

Для того чтобы выявить максимально полный спектр аутоантигенных пептидов, представленных на молекулах HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01, мы использовали два протокола подготовки образцов, а затем объединили полученные данные после LC-MS/MS. Первый метод включал иммунопреципитацию комплексов HLA-DR с применением моноклональных антител, специфичных к HLA-DR, ковалентно связанных со смолой Protein A. Второй метод представлял собой эксклюзионную хроматографию клеточного лизата ДК с выбором фракций, содержащих HLA-DR, по результатам иммуноферментного анализа (ИФА). Распределение длин идентифицированных пептидов оказалось соответствующим длинам пептидов, которые обычно представлены на молекулах HLA-DR в естественных условиях (13–17 ак) (Рисунок 5А). Однако в процессе клеточного лизиса и элюции пептидов некоторые антигенные последовательности подвергались укорачиванию, что, вероятно, было вызвано действием клеточных протеаз и условиями элюции. Это особенно заметно в случае с протоколом иммунопреципитации, где значительная часть пептидов имела длину 9 ак.

Для устранения этого экспериментального недочета, пептиды, длина которых была меньше 15 ак, были расширены до 15 ак на основе средней длины пептидов, презентуемых на молекулах HLA-DR. Это расширение проводилось с учетом максимальной расчетной аффинности, определенной с помощью NetMHCIIpan. Пептиды, имевшие перекрытие в сырых масс-спектрометрических данных, были объединены. В результате анализа образцов ДК пациентов с РА с использованием LC-MS/MS было идентифицировано 846 пептидов, из которых 39 были отнесены к РА-ассоциированным с помощью AAgAtlas. Среди пептидов, идентифицированных с помощью LC-MS/MS, 6 из 157 (3,8%) РА-ассоциированных пептидов, были также отобраны фаговым дисплеем для HLA-DRB1\*01:01. Для HLA-

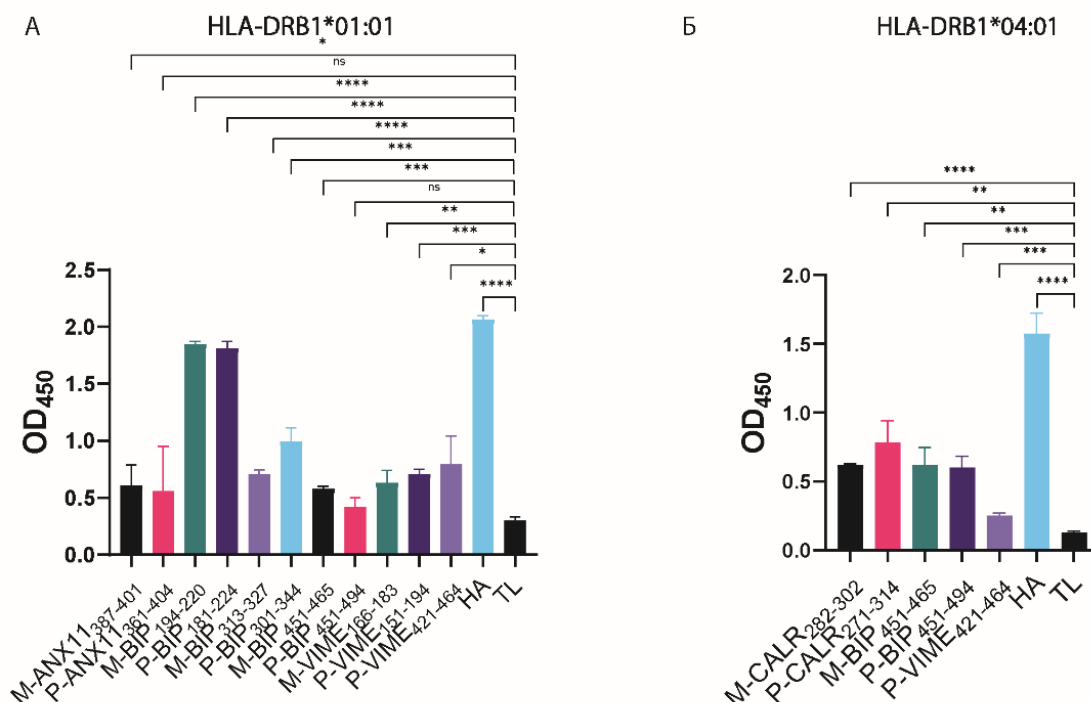
DRB1\*04:01 мы обнаружили 3 из 98 (3,1%) пептидов, отобранных также фаговым дисплеем (Рисунок 5Б).



**Рисунок 5. Аутоантигенные пептиды, идентифицированные с помощью LC-MS/MS и их пересечение с фаговым отбором.** (А) Распределение длины пептидов, анализируемых с помощью LC-MS/MS. (Б) На диаграммах Венна показано количество пептидов, отобранных с помощью фагового дисплея и LC-MS/MS и их пересечение для HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01.

Для проверки того, обладают ли аутоантигенные пептиды, идентифицированные с помощью LC-MS/MS и отобранные с помощью фагового дисплея (пептиды длиной 44 ак), идентичным эпитопом для связывания с HLA-DR, мы получили данные пептиды в слитой с *trx* форме, как в виде, в котором они были представлены в масс-спектрометрическом анализе, так и в виде последовательностей длиной 44 ак для проверки связывания с рекомбинантными HLA-DR *in vitro*. Примечательно, что P-VIME<sub>421-464</sub> был обнаружен в данных LC-MS/MS в полноразмерной для фагового дисплея форме длиной в 44 ак. В целом, все аутоантигенные пептиды продемонстрировали сопоставимое связывание с молекулами HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01, как в варианте длиной 44 ак, так и в короткой форме, несмотря на некоторые различия в предсказанной аффинности. Например, предсказанная аффинность для M-BIP<sub>313-327</sub> и M-BIP<sub>451-465</sub> была выше 500 нМ для HLA-DRB1\*01:01 по сравнению с 92 нМ для P-BIP<sub>301-344</sub> и 140 нМ для P-BIP<sub>451-494</sub> (Рисунок 6А). Аналогичным образом, пептиды M-CALR<sub>282-302</sub> и M-BIP<sub>451-465</sub>, идентифицированные LC-MS/MS для HLA-DRB1\*04:01, имели более низкую аффинность, предсказанную с помощью NetMHCIIpan, по сравнению с их

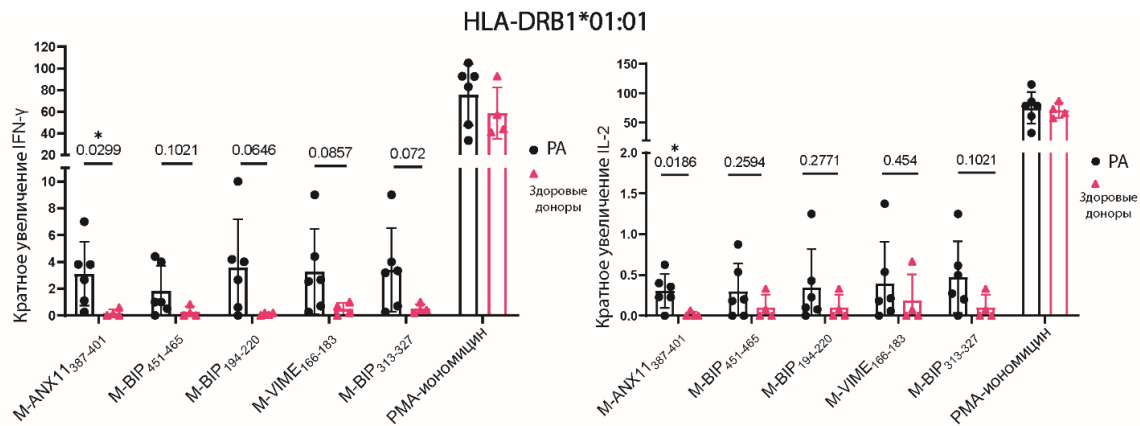
полноразмерными вариантами, но продемонстрировали аналогичное связывание в ИФА (Рисунок 6Б).



**Рисунок 6. Проверка связывания trх-пептидов с HLA-DR, отобранных LC-MS/MS.** (А) Рекombинантный HLA-DRB1\*01:01 (150 нМ) или (Б) HLA-DRB1\*04:01 инкубировали в течение 16–18 часов с биотинилированными рекombинантными trх-пептидами (750 нМ), отобранными LC-MS/MS. Trх-HA (фрагмент геммагглютинаина вируса гриппа А) использовался в качестве положительного контроля, TL (trх без пептида) в качестве отрицательного. М (mass spectrometry) – пептиды, отобранные LC-MS/MS.

Чтобы оценить роль полученных аутоантигенов при развитии РА, а конкретнее, возможность появления аутореаутивного CD4<sup>+</sup> Т-клеточного ответа на данные аутоантигены в комплексе с HLA-DR, выработку IFN-γ и IL-2 оценивали путем совместной инкубации PBMC HLA-DRB1\*01:01-положительных пациентов с РА (n=6) и HDs (n=4) или HLA-DRB1\*04:01-положительных пациентов с РА (n=5) и HDs (n=4) с синтетическими пептидами, одновременно отобранными фаговым дисплеем и LC-MS/MS с длиной идентифицированной LC-MS/MS. В отличие от других подобных пептидов, P-VIME<sub>421-464</sub> встречался в масс-спектрометрических данных также и HDs, поэтому для анализа CD4<sup>+</sup> Т-клеточного ответа не использовался. Среди используемых синтетических пептидов M-ANX11<sub>387-401</sub> вызывал статистически значимую разницу (p=0,0299) в выработке IFN-γ и (p=0,0186) IL-2 между HLA-DRB1\*01:01<sup>+</sup> больными с РА и HD (Рисунок 7). Разница между HLA-DRB1\*04:01<sup>+</sup> пациентами с РА и HD была статистически незначительной.





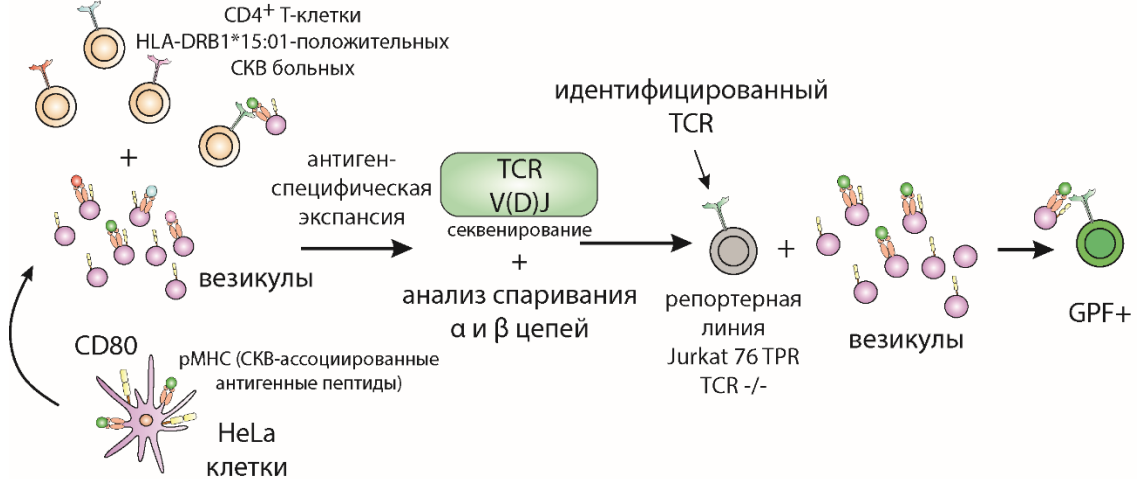
**Рисунок 7. Оценка продуцирования провоспалительных цитокинов CD4<sup>+</sup> Т-клетками пациентов с РА по сравнению с HDs.** Синтетические пептиды использовали для стимуляции CD4<sup>+</sup> Т-клеток из PBMC HLA-DRB1\*01:01<sup>+</sup> пациентов с РА (n=6) и HD (n=4) и детекции IFN-γ или IL-2. М (mass spectrometry) – пептиды, отобранные LC-MS/MS.

Аннексин A11 (ANX11) впервые охарактеризован как ассоциированный с РА аутоантиген через вовлечение аутореактивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Антитела к ANX11 ранее были описаны у пациентов с РА, а также были обнаружены в сыворотке крови пациентов с СКВ и антифосфолипидным синдромом (АФС), что свидетельствует о его участии в аутоиммунных процессах в целом. Подводя итог разделу, посвященному РА, были идентифицированы аутоантигенные пептиды, ассоциированные с РА, представленные на молекулах HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01, с использованием двух методов: скрининга библиотеки аутоантигенов человека *in vitro* и анализа иммунопептидома HLA-DR у пациентов с РА. Обнаруженные антигенные пептиды могут быть таргетированы аутореактивными CD4<sup>+</sup> Т-клетками в процессе патогенеза РА и имеют потенциал для разработки методов таргетной антиген-специфической терапии.

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

Для поиска аутоантигенных последовательностей, представленных на HLA-DR, был выбран СКВ-ассоциированный аллель HLA-DRB1\*15:01. Для этой цели также использовалась аутоантигенная библиотека для проведения фагового отбора на рекомбинантный HLA-DRB1\*15:01 по протоколу, аналогичному описанному выше (Рисунок 8). Учитывая, что известный репертуар аутореактивных TCR при СКВ ограничен, мы решили сфокусировать наши исследования на идентификации последовательности новых TCR, взаимодействующих с пептидами, представленными на HLA-DRB1\*15:01. Для этого отобранные аутоантигенные пептиды в комплексе с HLA-DRB1\*15:01 были представлены на искусственных EVs, которые использовались для стимуляции CD4<sup>+</sup> Т-клеток, полученных от пациентов с СКВ, несущих аллель HLA-DRB1\*15:01.

Экспандированные Т-клетки, прошедшие двухнедельную инкубацию с EVs, подвергались секвенированию репертуара TCR. Биоинформатический анализ позволил определить правильно спаренные  $\alpha$  и  $\beta$  цепи TCR, которые взаимодействовали с комплексами рМНС. Антиген-специфичность данных TCR была подтверждена путем активации с помощью EVs, несущих аутоантигенный пептид.

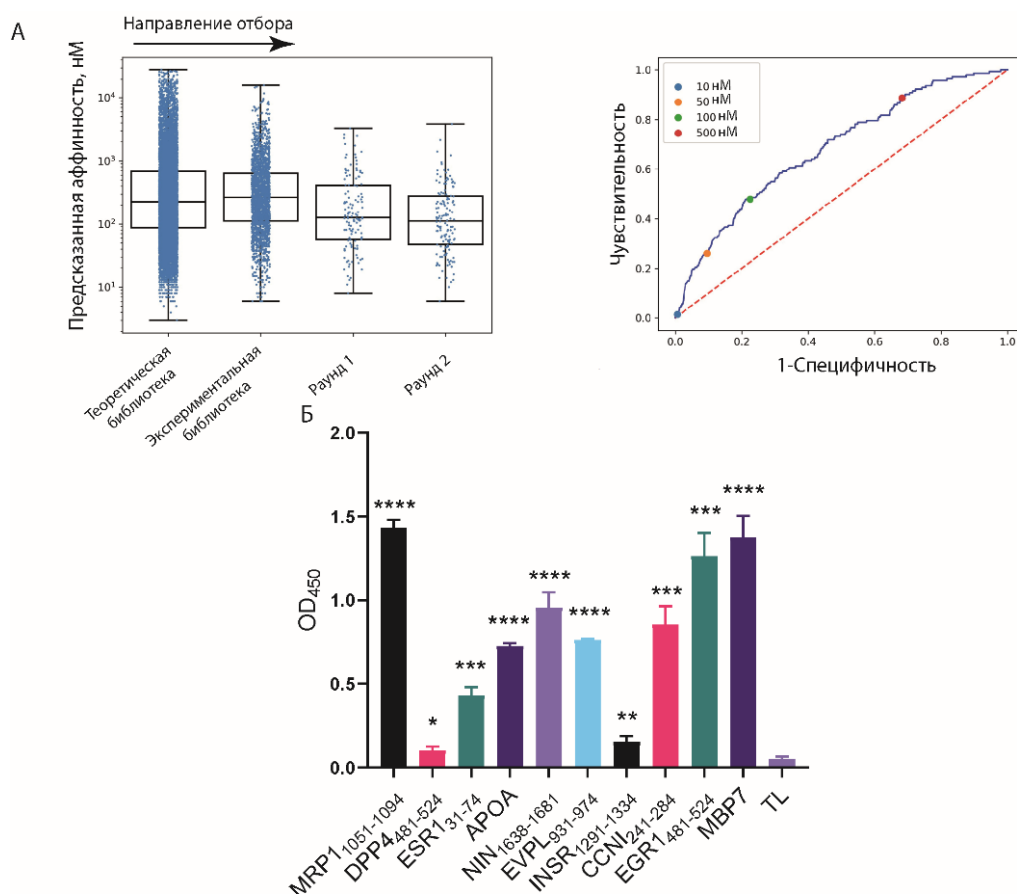


**Рисунок 8. Схема поиска новых аутоантигенов и взаимодействующих с ними TCR при развитии СКВ.** СКВ-ассоциированные аутоантигенные пептиды в комплексе с HLA-DRB1\*15:01 были представлены на искусственных EVs, чтобы стимулировать CD4<sup>+</sup> Т-клетки из пациентов с СКВ. Репертуар TCR, взаимодействующих с рМНС, был секвенирован, а их антиген-специфичность подтверждена с помощью репортерной линии Jurkat 76 TPR, несущей исследуемые TCR, в которой запускается синтез зеленого флуоресцентного белка (GFP) в ответ на стимуляцию специфичным комплексом рМНС на EVs.

Результаты фагового отбора, выполненного при аналогичных условиях, что и для HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01 показали, что с каждым раундом фагового отбора сродство связывающихся пептидов к HLA-DR увеличивалось (числовые значения предсказанной аффинности снижались). Уровень эффективности отбора был подтвержден значением AUC = 0,68 (Рисунок 9А).

Далее было проверено, будут ли аутоантигенные пептиды, обогащенные в ходе фагового отбора, связывать рекомбинантный белок HLA-DRB1\*15:01. Аутоантигенные пептиды выбирались на основе обогащения по результатам NGS во втором раунде отбора на HLA-DRB1\*15:01 и отсутствия во втором раунде контрольного отбора. Мы выбрали девять аутоантигенных пептидов и экспрессировали их в виде trх-пептидов, состоящих из 44 ак. Все выбранные trх-пептиды показали статистически значимое связывание с рекомбинантным HLA-DRB1\*15:01 после ночной инкубации (Рисунок 9Б), что подтверждает высокую релевантность результатов фагового отбора.





**Рисунок 9. Анализ эффективности фагового отбора на HLA-DRB1\*15:01.** (А) Предсказываемая аффинность лигандов увеличивается при фаговом отборе от исходной теоретической библиотеки ко второму раунду фагового отбора. ROC-кривые для лигандов, не прошедших ни одного отбора, против прошедших второй отбор. (Б) Рекombинантный HLA-DRB1\*15:01 (150 нМ) инкубировали в течение 16–18 часов с биотинилированными рекombинантными trх-пептидами (750 нМ), обогащенными в фаговом отборе. Trх-MBP7 (MBP<sub>85-99</sub>) использовался в качестве положительного контроля, TL в качестве отрицательного.

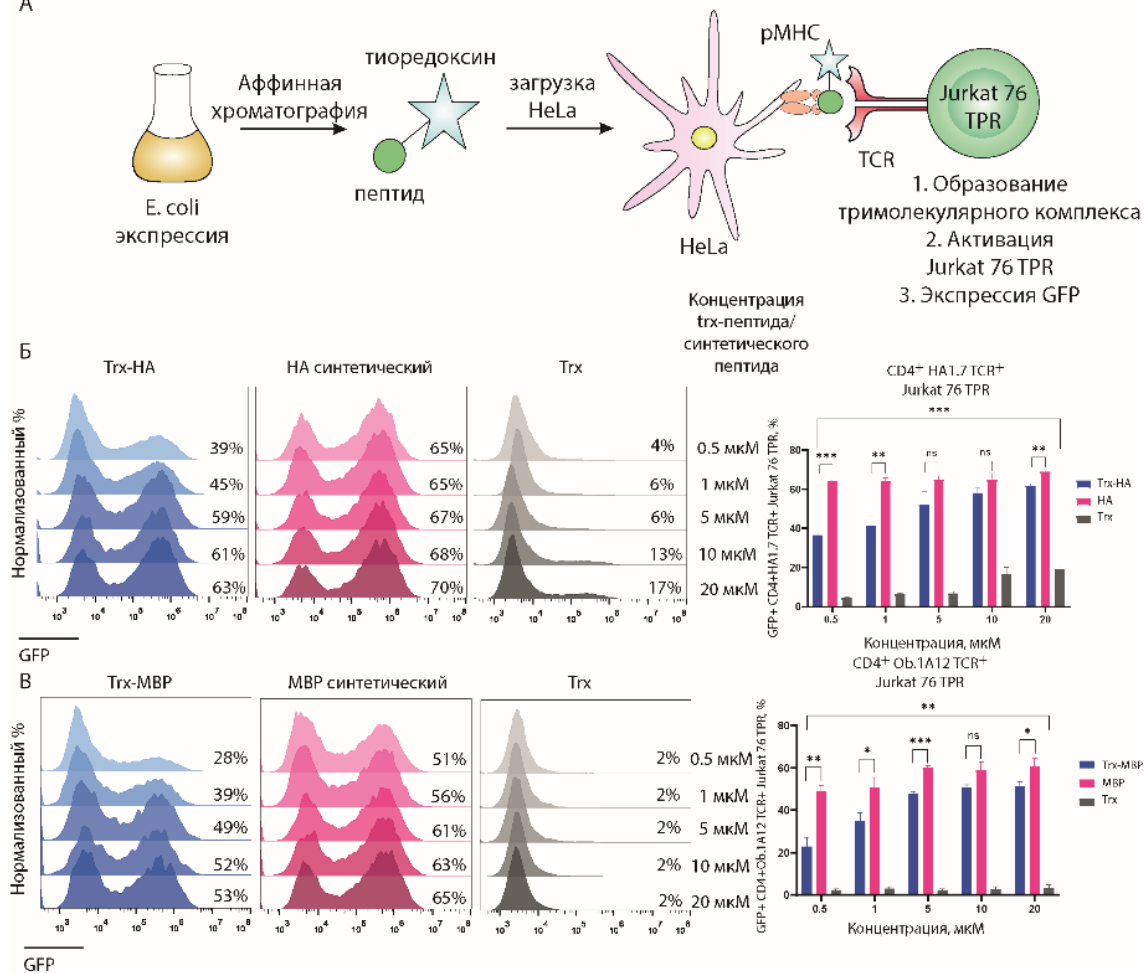
### Создание модифицированных клеточных линий для проверки антигенной специфичности TCR

Далее мы решили исследовать, могут ли идентифицированные аутоантигенные пептиды, отобранные фаговым дисплеем в комплексе с HLA-DRB1\*15:01, активировать TCR у пациентов с СКВ. Для этого была разработана модельная система для проверки антиген-специфичности TCR. Для оценки активации CD4<sup>+</sup> Т-клеток использовалась репортерная клеточная линия Jurkat 76 TPR, экспрессирующая зеленый флуоресцентный белок (GFP) при активации ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT) и не имеющая эндогенного TCR. Эта линия была дополнительно модифицирована для экспрессии CD4, необходимого для взаимодействия с комплексом рМНС, а также TCR HA1.7 или Ob.1A12. TCR HA1.7 специфичен к пептиду HA<sub>306-318</sub> гриппа А в контексте HLA-DRB1\*01:01, а Ob.1A12 – к аутоантигенному пептиду основного белка

миелина MBP<sub>85-99</sub> (MBP7) в контексте HLA-DRB1\*15:01. TCR HA1.7 связывает родственный комплекс pMHC с относительно высокой аффинностью, в то время как Ob.1A12 является аутореактивным TCR, демонстрируя более низкую аффинность к pMHC из-за альтернативной топологии позиционирования TCR.

Для презентации антигенных пептидов была использована модифицированная клеточная линия HeLa, несущая комплексы HLA-DR и костимулирующие молекулы CD80. Для проверки модельной системы активации к смешанным клеткам линий CD80<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> HeLa и CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR добавлялись соответствующие пептиды в синтетической или рекомбинантной форме, HA<sub>306-318</sub> или MBP7 (синтетический - MBP<sub>85-99</sub>, trx - MBP<sub>81-104</sub>), после чего оценивалась активация (Рисунок 10A).

A

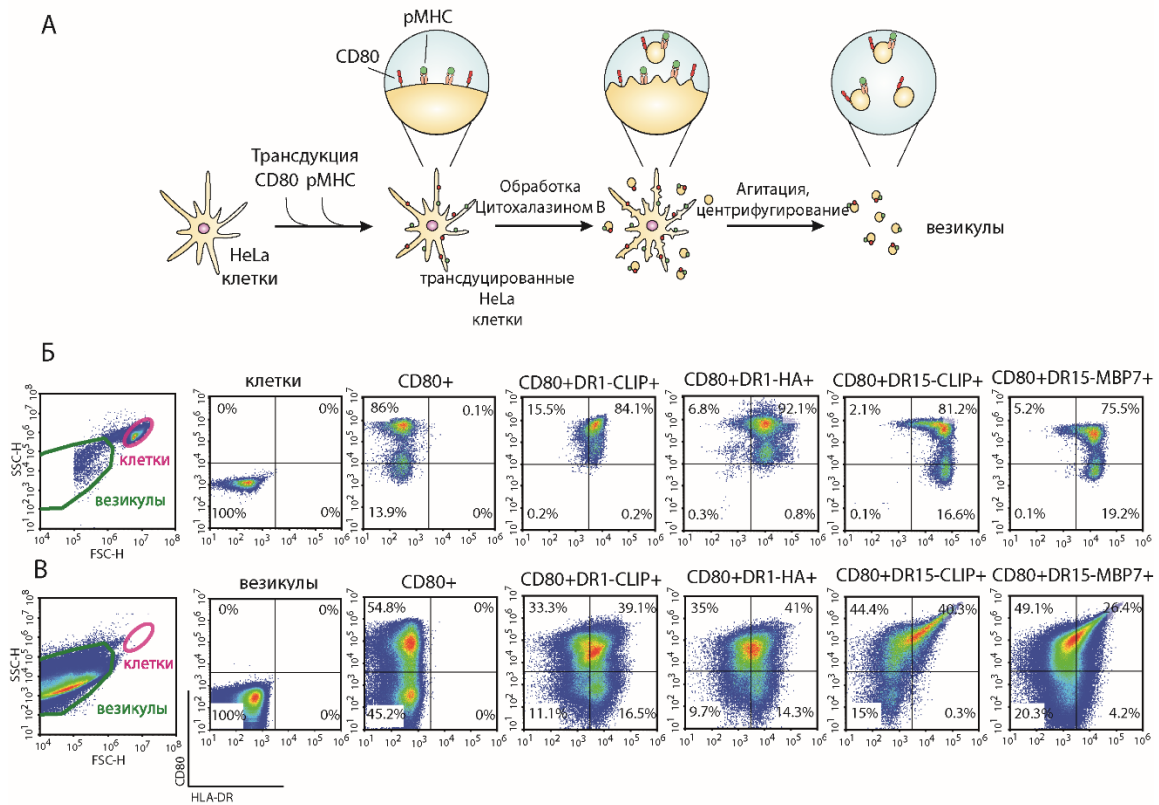


**Рисунок 10. Активация CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR с помощью клеточной линии CD80<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> HeLa.** (А) Схематическое изображение использования антигенных пептидов для активации CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR. (Б) CD4<sup>+</sup> HA1.7 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR или (В) CD4<sup>+</sup> Ob.1A12 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR инкубировали с (Б) CD80<sup>+</sup> HLA-DRB1\*01:01<sup>+</sup> HeLa или (В) CD80<sup>+</sup> HLA-DRB1\*15:01<sup>+</sup> HeLa в течение 16 часов с синтетическим пептидом (Б) HA или trx-HA или (В) MBP или trx-MBP в концентрации 0,5, 1, 5, 10 и 20 мкМ. Значения указывают процент активированных клеток, экспрессирующих GFP. Процент GFP-положительных клеток CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR, инкубированных с CD80<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> HeLa, загруженными

синтетическим пептидом или trх-пептидом в концентрации 0,5, 1, 5, 10 и 20 мкМ показан как среднее  $\pm$  стандартное отклонение трех повторов эксперимента.

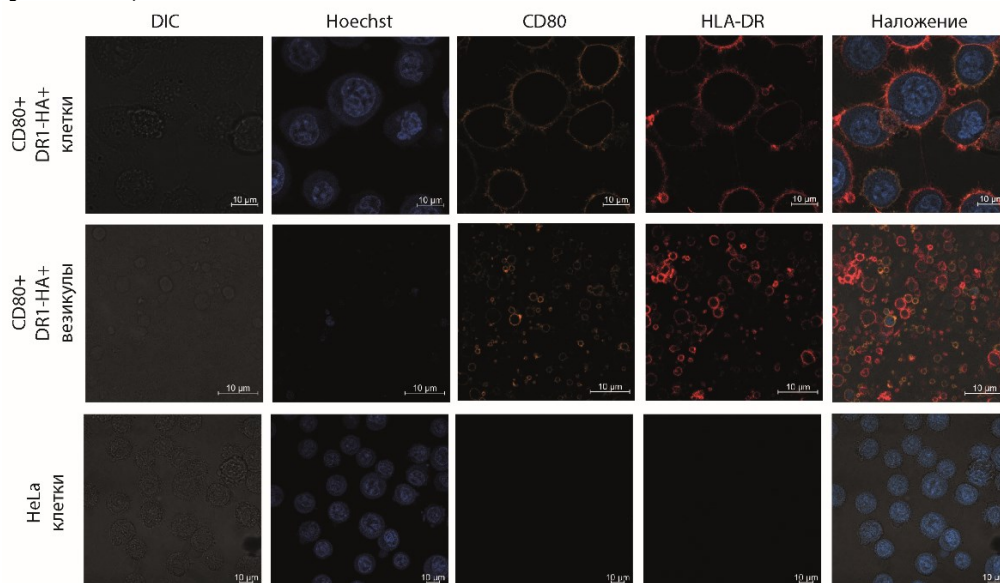
В результате активация линии CD4<sup>+</sup> HA1.7 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR происходила при добавлении синтетического пептида и trх-пептида, причем статистическая разница в активации между рекомбинантным и синтетическим HA отсутствовала при концентрациях антигена 5 и 10 мкМ (Рисунок 10Б). Подобная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

Далее мы решили использовать модифицированные клеточные линии HeLa для получения искусственных EVs, которые потенциально могут активировать CD4<sup>+</sup> Т-клетки и быть использованы для антиген-зависимой Т-клеточной экспансии. В данном случае линия CD80<sup>+</sup> HeLa была модифицирована комплексом рМНС, где конкретный пептид был ковалентно связан с N-концом  $\beta$  цепи HLA-DR, таким образом каждый комплекс HLA-DR был загружен необходимым антигенным пептидом. Для получения EVs клеточные линии CD80<sup>+</sup> рМНС<sup>+</sup> HeLa обрабатывали цитохалазином В, который вызывает быстрый распад актинового цитоскелета и образование удлиненных трубчатых выступов из клетки, которые можно отделить с помощью встряхивания (Рисунок 11А). Полученные EVs отделяли от клеток серией настольных центрифугирований. Эта процедура позволила получить EVs, несущие реплики белков поверхности мембраны, экспрессируемых исходной клеткой. Присутствие CD80 и рМНС на поверхности исходных клеток (Рисунок 11Б), а также на поверхности EVs (Рисунок 11В) было подтверждено с помощью проточной цитометрии. Для последующих экспериментов по активации нам понадобились EVs, несущие узнаваемые антигены для TCR HA1.7 и Ob.1A12 TCR: HA на HLA-DRB1\*01:01 (DR1-HA<sup>+</sup>) и MBP на HLA-DRB1\*15:01 (DR15-MBP7<sup>+</sup>), а также те же аллели, но с пептидом CLIP (DR1-CLIP<sup>+</sup>, DR15-CLIP<sup>+</sup>) в качестве отрицательного контроля.



**Рисунок 11. Создание искусственных EVs, несущих молекулы CD80 и pMHC.** (А) Схематическое изображение основных этапов получения EVs из клеточных линий CD80<sup>+</sup> pMHC<sup>+</sup> HeLa. (Б) Окрашивание на молекулы CD80 и HLA-DR на клеточных линиях HeLa. (В) Окрашивание на молекулы CD80 и HLA-DR на EVs, полученных из HeLa. Контрольные нетрансдуцированные клетки и трансдуцированные клетки или EVs окрашивали флуоресцентными антителами anti-human CD80-PE, anti-human HLA-DR-APC.

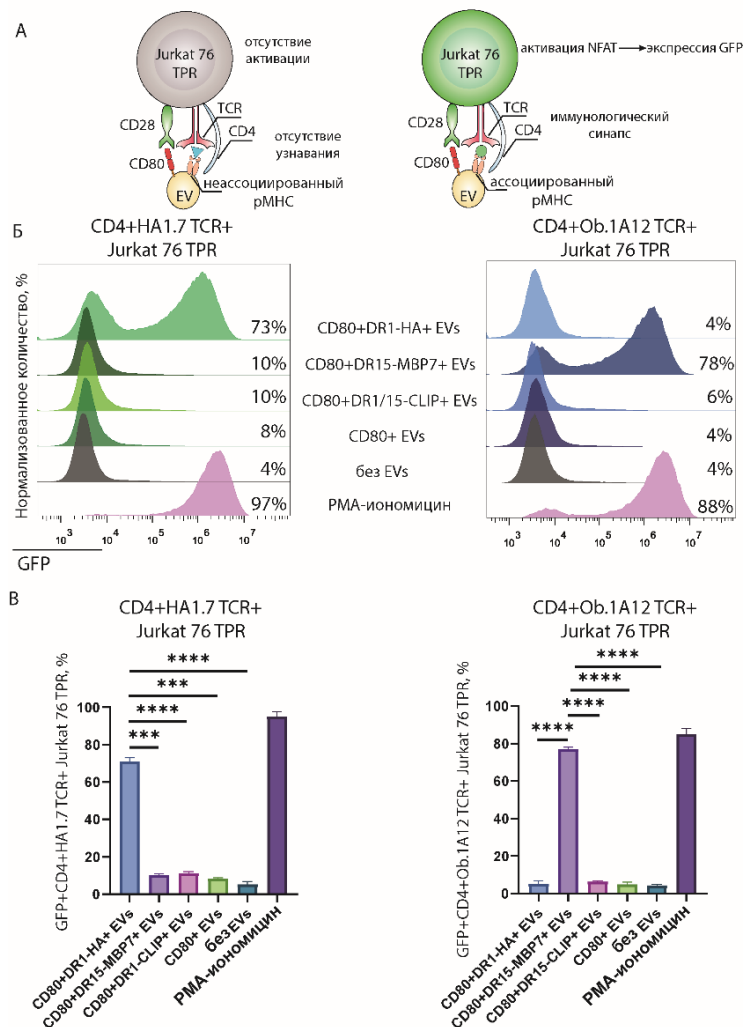
Нетрансдуцированные клетки, а также CD80<sup>+</sup> DR1-HA<sup>+</sup> клетки и полученные из них EVs дополнительно оценивались на экспрессию молекул CD80 и HLA-DR с помощью конфокальной микроскопии (Рисунок 12).



**Рисунок 12. Конфокальная микроскопия нетрансдуцированных HeLa и CD80<sup>+</sup> DR1-HA<sup>+</sup> HeLa или EVs.** Ядра были окрашены Hoechst 33342 (синий), а молекулы CD80 и HLA-DR были окрашены anti-human CD80-PE-(оранжевый) и anti-human HLA-DR-APC (красный) конъюгированными антителами, соответственно.

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

Затем мы оценили активационный потенциал EVs при инкубации с клеточными линиями CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR, где взаимодействие TCR с ассоциированным комплексом рМНС вызывает активацию Т-клеток и экспрессия GFP (Рисунок 13А), аналогично стимуляции CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR синтетическим или рекомбинантным антигенным пептидом. Полученные данные показали, что активация клеток CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR происходила исключительно при инкубации с EVs, несущими родственные комплексы рМНС (Рисунок 13Б). Антиген-специфичность активации была статистически значимой для обеих линий CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR (Рисунок 13В). Наши результаты демонстрируют способность CD80<sup>+</sup> рМНС<sup>+</sup> EVs стимулировать антиген-специфический ответ у модельных линий CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR.



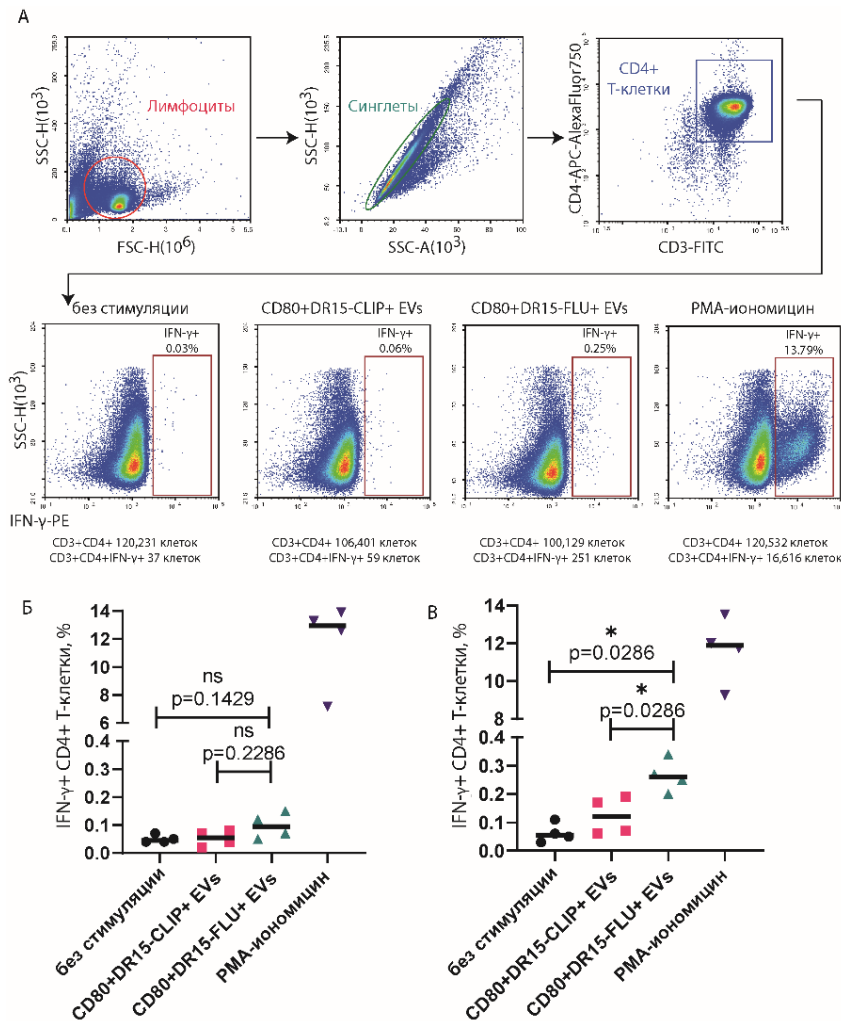
### Рисунок 13. Стимуляция клеток CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR посредством CD80<sup>+</sup> рМНС<sup>+</sup> EVs. (А)

Схематическое изображение активации NFAT, экспрессии GFP линиями CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR при распознавание родственного рМНС. (Б) Клетки CD4<sup>+</sup> HA1.7 TCR<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> Ob.1A12 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR инкубировали с 5-кратным избытком EVs в течение 16–18 часов. (В) Процент GFP-положительных клеточных линий CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR, подвергшихся инкубации с EVs, показан как среднее ± стандартное отклонение трех экспериментальных повторов.



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

Далее мы оценили возможность использования EVs для стимуляции и антиген-специфической экспансии CD4<sup>+</sup> Т-клеток человека. Мы выделили CD4<sup>+</sup> Т-клетки у четырех HLA-DRB1\*15:01<sup>+</sup> HDs. Изолированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки затем подвергались экспансии и рестимуляции с помощью EVs, несущих иммунодоминантный эпитоп гемагглютинина вируса гриппа В (Flu В HA<sub>270-286</sub>), представленный в комплексе HLA-DRB1\*15:01 (DR15-FLU) или, в качестве контроля, DR15-CLIP. После повторной стимуляции Т-клетки были окрашены антителами к IFN- $\gamma$ . Стратегия окрашивания CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Т-клеток, а также репрезентативные графики представлены на Рисунке 14А. Разница в активации между DR15-FLU и DR15-CLIP для CD4<sup>+</sup> Т-клеток, не подвергшихся предварительной антиген-специфичной экспансии, была статистически незначительной (Рисунок 14Б). Однако разница в проценте клеток IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> между стимуляцией EVs с DR15-FLU или DR15-CLIP после антиген-специфической экспансии была статистически значимой (P=0,0286) (Рисунок 14В). В совокупности наши результаты иллюстрируют эффективность применения EVs для стимулирования пролиферации антиген-специфических CD4<sup>+</sup> Т-клеток.



**Рисунок 14. Антиген-специфическая экспансия CD4<sup>+</sup> Т-клеток человека с помощью EVs.** (А) Стратегия окрашивания CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Т-клеток из общей популяции лимфоцитов. (Б) Изолированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки из четырех HDs инкубировали с EVs в течение 16–18 часов перед оценкой продукции IFN- $\gamma$ . (В) Изолированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки из четырех HDs подвергали антиген-специфичной экспансии с CD80<sup>+</sup> DR15–FLU<sup>+</sup> EVs. Спустя 10 дней происходила рестимуляция EVs в течение 16–18 часов перед оценкой продукции IFN- $\gamma$ .

### **Использование EVs для антиген-специфической экспансии CD4<sup>+</sup> Т-клеток пациентов с СКВ позволило идентифицировать последовательности TCR**

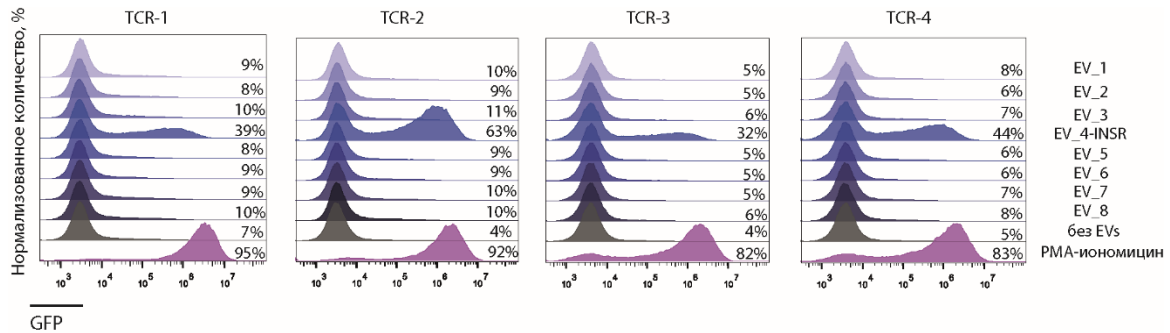
Для поиска TCR, взаимодействующих с аутоантигенными пептидами, и оценки их последовательностей у пациентов с СКВ, мы выбрали 16 аутоантигенных пептидов, ассоциированных с СКВ, которые были отобраны в результате фагового дисплея или имели высокую предсказанную аффинность к HLA-DRB1\*15:01 по данным NetMHCIIpan.

Эти пептиды были экспрессированы в комплексе с HLA-DRB1\*15:01 на поверхности клеточной линии CD80<sup>+</sup> HeLa. На основе полученных линий было создано 16 типов EVs, соответствующих числу пептидов. Эти 16 типов EVs были разделены на две группы для дальнейшей антиген-специфической экспансии CD4<sup>+</sup> Т-клеток трех пациентов с СКВ. Для каждой группы EVs для каждого пациента выполнялось четыре технических повтора. По завершению 14-дневной экспансии из CD4<sup>+</sup> Т-клеток были подготовлены библиотеки для NGS секвенирования TCR. Благодаря глубине секвенирования (100 прочтений на Т-клетку) было возможно точно сопоставить количество транскриптов  $\alpha$  и  $\beta$  цепей TCR и определить, какие из них принадлежат одной Т-клетке. В результате секвенирования были выявлены экспансированные последовательности четырех TCR для первой группы EVs одного пациента (Таблица 1). Эти последовательности имели одинаковый вариабельный регион  $\alpha$  цепи – TRAV14DV, что потенциально указывает на то, что эти TCR экспансировались в ответ на один и тот же аутоантигенный пептид.

**Таблица 1. Последовательности экспансированных TCR.**

№	TCR	CDR3 $\alpha$	V регион	J регион	CDR3 $\beta$	V регион	D регион	J регион
		TCR $\alpha$			TCR $\beta$			
1	TCR-1	CAMRVTG NQFYF	TRAV14D V4	TRAJ49	CAIRGTSGAS FSYEQYF	TRBV10- 3	TRBD2	TRBJ2-7
2	TCR-2	CAMRGGT GGFKTIF	TRAV14D V4	TRAJ9	CASSGISTLSN EQFF	TRBV5-4	TRBD2	TRBJ2-1
3	TCR-3	CAMRERI RSQGNLIF	TRAV14D V4	TRAJ42	CASSSTSYITG ELFF	TRBV5-4	TRBD2	TRBJ2-2
4	TCR-4	CAMRPGP RRALTF	TRAV14D V4	TRAJ5	CASSSGLATT GELFF	TRBV5-4	TRBD2	TRBJ2-2

Из данных последовательностей вариабельных регионов и CDR3 были собраны конструкции полноразмерных TCR, которые были использованы для трансдукции линии CD4<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR. Полученные линии инкубировали по отдельности с EVs. В результате все четыре линии CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR были активированы EVs, несущими фрагмент инсулинового рецептора INSR<sub>1297-1311</sub> в контексте HLA-DRB1\*15:01 (Рисунок 15).



**Рисунок 15. Фрагмент INSR<sub>1297-1311</sub> активирует CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR.** Линии CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR инкубировали с 2,5-кратным избытком EVs в течение 16–18 часов. Стимуляцию PMA и иономицином использовали в качестве неспецифического положительного контроля. Анализ проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Значения указывают процент активированных GFP-экспрессирующих клеток CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR.

СКВ является чрезвычайно гетерогенным заболеванием, поражающим различные органы вследствие таргетирования аутореактивными Т- и В-клетками различных аутоантигенов. Часто СКВ сопровождается развитием сопутствующих синдромов. Одним из таких синдромов является инсулинорезистентность типа В, характеризующаяся наличием аутоантител к INSR, которые ингибируют связывание инсулина с его рецептором. На настоящий момент отсутствуют опубликованные эпитопы INSR, активирующие аутореактивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки.

Таким образом, используя аутоантигенную фаговую библиотеку мы идентифицировали новый эпитоп CD4<sup>+</sup> Т-клеток в аутоантигене INSR, потенциально вовлеченный в патогенез СКВ. Создание модельных клеточных линий CD80<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> HeLa и получение из них EVs, а также использование клеток CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR, позволило выявить INSR-специфичные CD4<sup>+</sup> Т-клетки и оценить формирование тримолекулярных комплексов между аутоантигенными фрагментами и идентифицированными TCR. Полученные результаты могут послужить основой для разработки терапевтических стратегий, основанных на последовательностях аутоантигенных фрагментов и взаимодействующих с ними TCR при СКВ.



## **ВЫВОДЫ**

1. В результате скрининга аутоантигенной бактериофаговой библиотеки найдены новые аутоантигенные пептиды, потенциально участвующие в патогенезе ревматоидного артрита и системной красной волчанки, представленные на молекулах HLA-DRB1\*01:01, HLA-DRB1\*04:01 и HLA-DRB1\*15:01, соответственно.
2. Масс-спектрометрический анализ иммунопептидома HLA-DR дендритных клеток пациентов с ревматоидным артритом и здоровых доноров, несущих аллели HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01, позволил идентифицировать аутоантигенные пептиды, ассоциированные с ревматоидным артритом. Установлено, что часть пептидов, идентифицированных в результате масс-спектрометрического анализа, идентична пептидам, отобраным с помощью фагового дисплея, что свидетельствует в пользу высокой релевантности выявленных аутоантигенов как природных лигандов данных HLA-DR.
3. Детектирован аутореактивный CD4<sup>+</sup> Т-клеточный ответ на новый аутоантигенный пептид аннексина A11 (ANX11<sub>387-401</sub>) в комплексе с HLA-DRB1\*01:01 во фракции моноклеарных клеток пациентов с РА, что свидетельствует о потенциальной роли данного аутоантигена в патогенезе ревматоидного артрита.
4. Создана система стимуляции и антиген-специфической экспансии человеческих CD4<sup>+</sup> Т-клеток с использованием искусственных внеклеточных везикул, несущих ко-стимулирующие молекулы CD80 и комплексы рМНС.
5. С помощью искусственных внеклеточных везикул обнаружены последовательности четырех Т-клеточных рецепторов, взаимодействующих с фрагментом инсулинового рецептора (INSR<sub>1297-1311</sub>) в комплексе с HLA-DRB1\*15:01 при системной красной волчанке.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Ishina I.A.**, Zhiyanov A.P., Kurbatskaia I.N., Mamedov A.E., Nersisyan S.A., Ziganshin R.H., Eliseev I.E., Petrusenko Y.S., Nikonova A.V., Zhbanova E.S., Salnikova M.A., Ovchinnikova L.A., Mamedov I.Z., Davydov A.N., Nurbaeva K.S., Lisitsyna T.A., Reshetnyak T.M., Lila A.M., Nasonov E.L., Lomakin Y.A., Belogurov A.A., Zhang H., Tonevitskiy A.G., Rubtsov Y.P., Gabibov A.G., Zakharova M.Y. Autoantigenic peptide landscape of rheumatoid arthritis-associated HLA class II // *Genes & Diseases*. 2024. P. 101469. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2024.101469>.
2. **Ишина И.А.**, Захарова М.Ю., Курбацкая И.Н., Мамедов А.Э., Белогуров А.А., Рубцов Ю.П., Габибов А.Г. Гибридные белки, содержащие антигенный эпитоп и тиоредоксин для *in vitro* стимуляции CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat Т-клеток // Доклады Российской Академии Наук.

Науки О Жизни. 2024. Т. 516., С. 64–68.  
<https://doi.org/10.31857/S2686738924030119>.

3. **Ishina I.A.**, Kurbatskaia I.N., Mamedov A.E., Shramova E.I., Deyev S.M., Nurbaeva K.S., Rubtsov Y.P., Belogurov A.A., Gabibov A.G., Zakharova M.Y. Genetically engineered CD80–pMHC-harboring extracellular vesicles for antigen-specific CD4<sup>+</sup> T-cell engagement // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2024. V. 11. P. 1341685. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1341685>.

4. **Ishina I.A.**, Zakharova M.Y., Kurbatskaia I.N., Mamedov A.E., Belogurov A.A., Gabibov A.G. MHC Class II Presentation in Autoimmunity // *Cells*. 2023. V. 12. № 2. P. 314. <https://doi.org/10.3390/cells12020314>.

5. **Ishina I.A.**, Filimonova I.N., Zakharova M.Y., Ovchinnikova L.A., Mamedov A.E., Lomakin Y.A., Belogurov A.A. Exhaustive Search of the Receptor Ligands by the CyCLOPS (Cytometry Cell-Labeling Operable Phage Screening) Technique // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. V. 21. № 17. P. 6258. <https://doi.org/10.3390/ijms21176258>.

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