

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

На правах рукописи

*Ломакин Яков Анатольевич*

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

**Специальность**  
03.01.03 Молекулярная биология

диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
к.х.н. Белогуров А.А.

Москва – 2014

## Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	3
АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ .....	4
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	7
<b>1. Рассеянный склероз</b> .....	7
1.1 Роль Т-клеток в развитии и патологии рассеянного склероза .....	9
1.2 Роль В-клеток в развитии и патологии рассеянного склероза .....	14
1.3 Структурные особенности CDR и проблема кроссреактивности антител. ....	18
1.4 Этиология рассеянного склероза .....	22
1.5 Вирусное влияние на развитие Рассеянного Склероза (Инфекционные факторы окружающей среды) .....	24
1.5.1 Вирус Эпштейн-Барр .....	27
1.5.2 Человеческий вирус герпеса 6 .....	31
1.5.3 Вирус ветряной оспы .....	32
1.5.4 Вирус Торке Тено .....	32
1.5.5 Цитомегаловирус .....	33
1.5.6 Вирус простого герпеса .....	34
1.5.7 Человеческий эндогенный ретровирус (HERV) .....	34
<b>2. Комбинаторные библиотеки</b> .....	36
2.1 Комбинаторные фаговые библиотеки антител человека .....	36
2.2 Конструирование иммунных библиотек .....	41
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	44
1. Проверка функциональности фаг-дисплейной библиотеки репертуара одноцепочечных антител больных рассеянным склерозом .....	44
2. Скрининг библиотеки на ОБМ и получение моноклональных одноцепочечных антител, связывающих ОБМ. ....	46
3. Анализ полученных одноцепочечных антител, связывающих ОБМ .....	49
3.1 Анализ одноцепочечных анти-ОБМ антител, экспонированных на бактериофаге. ....	49
3.2 Анализ одноцепочечных антител в индивидуальном виде. ....	50
3.3 Определение гомологии зародышевых линий .....	54
4. Получение полноразмерных человеческих антител на основе одноцепочечных антител, связывающих ОБМ .....	58
4.1 Доказательство <i>in vitro</i> кроссреактивности между аутоантигеном ОБМ и белком вируса Эпштейна-Барр LMP1 .....	58
5. Рациональный анализ комбинаций тяжелых и легких цепей анти-ОБМ антител, полученных комбинаторным подходом. ....	60
5.1 Изучение изменения уровня кроссреактивности в зависимости от комбинации цепей с использованием технологии Lumipex .....	61
5.2 Изучения изменения аффинности к антигену (ОБМ) путем измерения констант диссоциации с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса ...	64
6. Биоинформатический анализ аутореактивных IgG .....	67
7. Широкомасштабное секвенирование. ....	73
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	86
Работа с нуклеиновыми кислотами .....	86
Аmplификация фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции .....	86
Рестрикция .....	86
Лигирование .....	86
Выделение плазмидной ДНК .....	87

Электрофорез ДНК в агарозном геле .....	88
Электрофорез ДНК в полиакриламидном геле .....	88
Электроэлюция .....	89
Секвенирование плазмидной ДНК .....	89
Широкомасштабное секвенирование генов переменных участков V <sub>H</sub> /V <sub>L</sub> из фаг- дисплейных библиотек .....	89
Параметры фильтров для анализа встречаемости гиперпеременных участков .....	90
Создание генетических конструкций для экспрессии рекомбинантных одноцепочечных антител .....	90
Создание генетических конструкций для экспрессии рекомбинантных полноразмерных антител .....	91
<b>РАБОТА С БЕЛКАМИ</b> .....	92
Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле .....	92
Окрашивание ПААГ .....	93
Иммуноблоттинг .....	93
Имуноферментный анализ .....	94
<b>ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОЦЕДУРЫ</b> .....	95
Выделение и очистка рекомбинантных антител .....	95
Очистка рекомбинантных одноцепочечных антител (scFv) .....	95
Выделение и очистка рекомбинантных фьюжн-белков trx-обм пептидов .....	96
Обращенно-фазовая хроматография .....	97
Молекулярное моделирование .....	97
Метод поверхностного плазмонного резонанса .....	98
Анализ кроссреактивности антител с использованием технологии Luminex .....	98
<b>МЕТОДЫ РАБОТЫ С БАКТЕРИЯМИ <i>ESCHERICHIA COLI</i></b> .....	99
Получение электрокомпетентных клеток .....	99
Трансформация клеток E.coli методом электропорации .....	99
ПЦР с колоний .....	100
Ночная культура .....	101
Приготовление музейного штамма .....	101
Экспрессия рекомбинантных белков МОГ, пептидов ОБМ в клетках E. Coli .....	101
<b>РАБОТА С ФАГАМИ</b> .....	101
Аmplификация библиотеки .....	101
Обогащение библиотеки фаговыми антителами .....	102
<b>МЕТОДЫ РАБОТЫ С ЭУКАРИОТИЧЕСКИМИ КЛЕТКАМИ</b> .....	103
Ведение культуры эукариотических клеток линии СНО и НЕК-293 .....	103
Приготовление музея эукариотических клеток .....	104
Выведение линии эукариотических клеток из заморозки .....	104
Трансфицирование эукариотических клеток методом липофекции .....	104
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	106
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	107
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ</b> .....	119

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ат – антитело  
АПК – антигенпредставляющая клетка  
ВЭБ – вирус Эпштейн-Барр  
ГКГС (МНС) – главный комплекс гистосовместимости  
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер  
ГЦ – герминативный центр  
ДМСО – диметилсульфоксид  
ДНК – дезокси-рибонуклеиновая кислота  
ДСН – додецилсульфат натрия  
ЭАЭ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит  
ИЛ – интерлейкин  
ИМ – инфекционный мононуклеоз  
ИФА – иммунно-ферментный анализ  
ИФНб – интерферон-бета  
кДа – килодальтон  
МОГ – миелин-олигодендроцитарный гликопротеин  
ОБМ – основной белок миелина  
ПААГ – полиакриламидный гель  
ПДРФ – полиморфизм длин рестриктовых фрагментов  
ПК – плазматическая клетка  
ПЛП – протеолипидный протеин  
ППР – поверхностно-плазмонный резонанс  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
ЦНС – центральная нервная система  
ЦСЖ – цереброспинальная жидкость  
ФСБ – фосфатно-солевой буфер  
РС – рассеянный склероз  
CDR – *англ.* complementarity determining region  
EBNA-1 – *англ.* Epstein Barr nuclear antigen 1  
IgG – иммуноглобулины класса G  
IPTG - изопрропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид  
LMP1- *англ.* latent membrane protein 1  
scFv – одноцепочечное антитело (*англ.* single chain fragment variable)  
Th – Т-хелперы  
Tr, Treg – Т-регуляторные клетки

## АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

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

К сожалению, пробелы в знании этиологии РС приводят к отсутствию эффективной терапии данного заболевания. Современные лекарственные средства, оказывая супрессирующее влияние на иммунные клетки и процессы воспаления, уменьшают частоту обострений и в целом лишь замедляют развитие заболевания. Наиболее широко применяемые методы лечения основаны на введении пациентам с РС противовоспалительного цитокина бета-интерферона. Хорошо известен препарат Копаксон (глатимер ацетата) –

конкурирующий с собственными антигенами за связывание с антиген-презентирующими клетками (АПК), или Новантрон, подавляющий пролиферацию Т, В-клеток и макрофагов путем ингибирования синтеза ДНК и РНК. В последнее время перспективной выглядит терапия моноклональными антителами, в том числе направленная и на элиминацию В-клеток. Стоит отметить, что подобные моноклональные антитела нацелены на уменьшение иммунных и воспалительных процессов путем тотального уничтожения или подавления функций целых популяций иммунных клеток, что приводит к негативному влиянию на иммунную систему в целом. В последнее время становится очевидным, что для направленной элиминации именно патогенных аутореактивных клеток необходимо знание специфических маркеров, характерных для этих клеток.

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

В качестве основных аутоантигенов выделяют четыре белка миелиновой оболочки: основной белок миелина (ОБМ), миелин-олигодендроцитарный

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

# ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1. Рассеянный склероз

Рассеянный склероз – хроническое воспалительное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы, поражающее в основном людей молодого и среднего возраста [1]. При частоте 3 случая на 10000 человек населения РС является наиболее широко распространённым демиелинизирующим нейровоспалительным заболеванием, при котором по пока непонятным причинам иммунная система организма начинает разрушать собственные миелиновые оболочки [2]. В мире насчитывается более 2.5 млн людей, страдающих от этого недуга [1]. Рассеянный склероз является одним из самых дорогостоящих неврологических заболеваний. Например, в США средние затраты на лечение одного больного РС в год составляют около 30 тысяч долларов.

Различают четыре типа развития заболевания - ремиттирующий, рецидивно-ремиттирующий, вторичный прогрессирующий и первичный прогрессирующий рассеянный склероз. В 80% случаев развитие заболевания начинается с рецидивно-ремиттирующего течения, для которого характерно чередование периодов обострения и восстановления. Высокая частота обострений (42-57%) не позволяет полностью восстановить функции нейрорегуляции, что приводит к перманентным нарушениям. Со временем в течение 6-10 лет у 30-40% пациентов РС переходит во вторично-прогрессирующее течение [3]. Значительно реже, в 20% случаев, РС сразу же принимает первично-прогрессирующую форму [4].

Как уже упоминалось, на сегодняшний день не существует способа полного излечения от РС. Чаще всего в терапии РС применяют иммуномодуляторный подход, чтобы предотвратить инфильтрацию лейкоцитов и тем самым образование новых бляшек. Тем не менее, способа восстановления уже существующих бляшек на настоящий момент не найдено [5]. Несколько препаратов бета-интерферонов (Бетаферон, Ребиф, Авонекс, Экставиа) были одобрены FDA и EMEA, однако они могут вызывать побочные



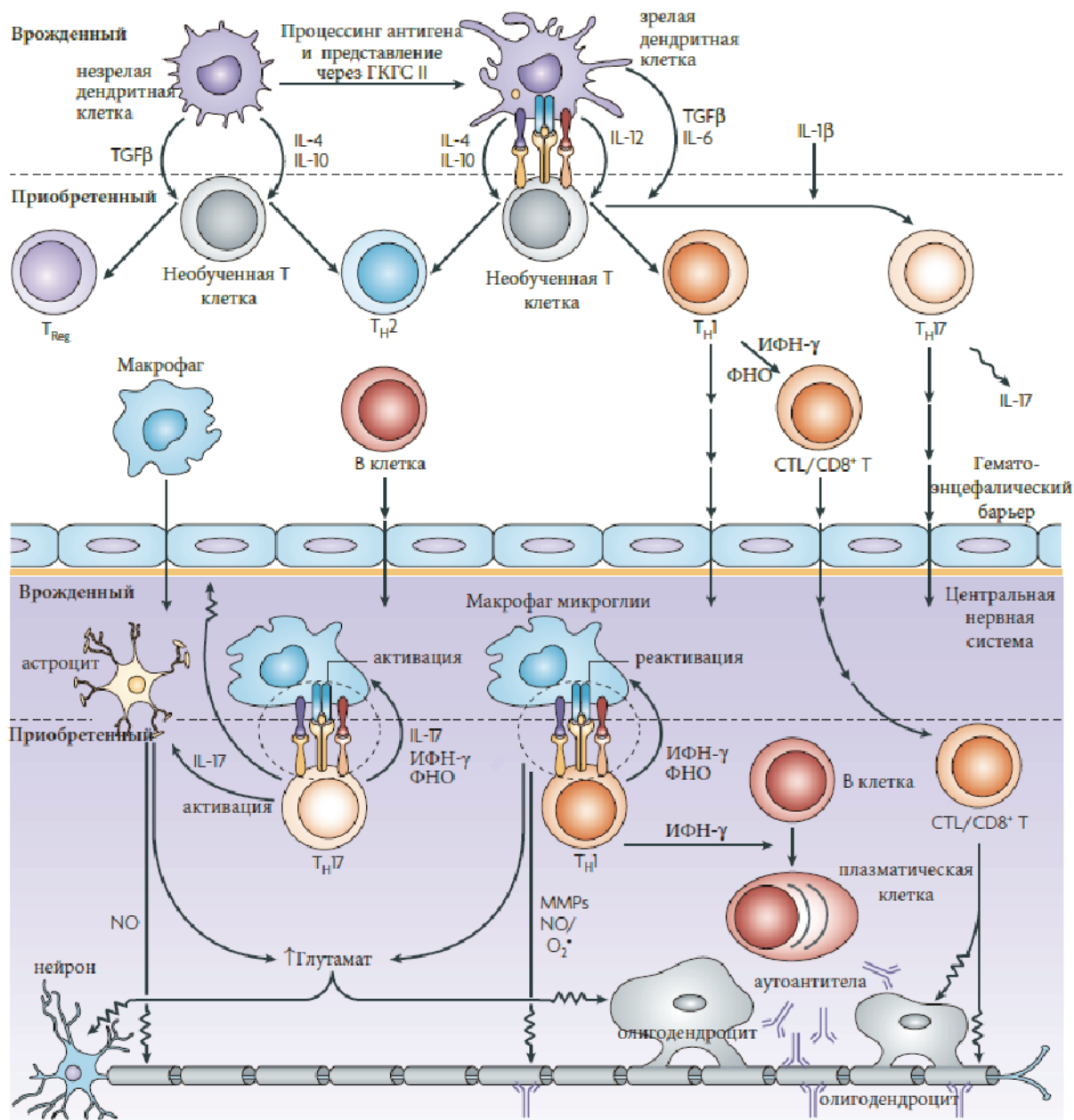
эффекты, вынуждая до 20% пациентов прекратить лечение или даже приводя к заболеваниям мозга[6]. С успехом в клиническую практику вводят глюкокортикоиды для подавления обострений и препарат мидантан (амантадин) для уменьшения апатии. Разработаны и другие противовоспалительные препараты, замедляющие развитие РС, такие как Новантрон (синтетическое производное антрацендиона), который, встраиваясь в молекулы ДНК, блокирует процессы репликации и транскрипции и, тем самым, подавляет пролиферацию Т, В-клеток и макрофагов или Копаксон (глатимер ацетата) – чей механизм действия до конца не известен, но предполагается, что он конкурирует с ОБМ за связывание с главным комплексом гистосовместимости II класса (ГКГС), тем самым изменяя баланс Th1-Th2 ответа в сторону Th2, что приводит к уменьшению воспаления, опосредованного Т-клетками. Стоит отметить, что терапия моноклональными антителами в практике имеет ряд преимуществ из-за специфичности узнаваемых мишеней и непревзойденной стабильности полноразмерных антител в кровотоке, уменьшая тем самым побочные эффекты и частоту применения за счет продления времени действия препарата (до нескольких недель или даже месяцев). Создаются вакцины, направленные на элиминацию аутореактивных В-клеток, среди которых наиболее известен уже зарегистрированный препарат – ритуксимаб – моноклональное антитело, неселективно уничтожающее все В-клетки (анти-CD20). К сожалению, его эффективность после III этапа клинических испытаний находится под вопросом [7]. В целом, за последнее время был предложен целый ряд новых рекомбинантных человеческих моноклональных антител, таких как Натализумаб (анти-альфа4-интегрин), Алемтузумаб (анти-CD52) и Даклизумаб (анти-CD25 ИЛ-Ра). Необходимо отметить, что, как и в случае с Ритуксимабом, все эти моноклональные антитела нацелены на неселективное уменьшение иммунных и воспалительных процессов, путем уничтожения или подавления функций иммунных клеток в целом, что приводит к негативному влиянию на иммунную систему. В связи с этим большая надежда отводится

экспериментальным проектам, направленным на специфическую элиминацию [8] или супрессию [9] именно аутореактивных патогенных В-клеток.

### **1.1 Роль Т-клеток в развитии и патологии рассеянного склероза**

Как уже упоминалось ранее, этиология РС до сих пор не определена, тем не менее, существует множество гипотез его развития. Одни гипотезы постулируют, что различные типы клеток иммунной системы активируются на периферии и затем входят в ЦНС, приводя к патологии. Согласно другим вариантам начальное нарушение происходит в ЦНС; возможные патологические процессы состоят из митохондриальной дисфункции в нейронах или олигодендроцитах, энергетической недостаточности аксонов или дезактивации нейрональных органелл, таких как пероксисомы [10].

Развитие РС на клеточном уровне характеризуется инфильтрацией Т-клеток, активацией микроглии и притоком гемопоэтических моноцитов в ЦНС. Иммунный ответ в основном направлен против олигодендроцитов, миелин-продуцирующих клеток, что приводит к деградации миелиновой оболочки, гибели клеток глии, и, как следствие, к уменьшению нервной проводимости. Показано, что деградация нервного волокна может происходить и из-за специфических атак на аксоны [11]. Схематически клеточные процессы при развитии РС изображены на **Рисунке 1**. Чрезмерно-активированные (*англ.* abnormally activated) зрелые дендритные клетки могут быть обнаружены у больных РС, при этом нарушается эффективность регуляции и иммунной толерантности. Это способствует клональной амплификации ауто- и кросс-реактивных Т-клеток в лимфоузлах. В результате образуются CD4<sup>+</sup> Т-хелперы (Th1 и Th2) и CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-лимфоциты, способные проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в ЦНС. Внутри ЦНС эти клетки реактивируются, клонально амплифицируются и окончательно дифференцируются при встрече со своими антигенами, представленными дендритными клетками – профессиональными АПК [12, 13].



**Рисунок 1.** Схематическое изображение патофизиологических процессов при РС. Адаптировано из [14].

Присутствие аутореактивных Th1/Th2 и цитотоксических лимфоцитов, а также плазматических В-клеток в ЦНС вкупе с ненормально активированными астроцитами и микроглией приводит к увеличенной продукции провоспалительных цитокинов и аутореактивных антител, повышению уровня металлопротеиназ, оксидантов и направленной цитотоксичности, что проявляется в усиливающейся демиелинизации и аксонально-нейрональном повреждении и разрушении ГЭБ.

При активации иммунные клетки при участии молекул адгезии прилипают к эндотелиальным клеткам посткапилляров в ЦНС. После

пересечения эндотелиального клеточного барьера иммунные клетки проходят через базальную мембрану. Затем благодаря в основном протеолитической активности большого семейства металл-зависимых протеиназ они мигрируют через второй слой базальной мембраны, пограничную глиальную мембрану и паренхимальную базальную мембрану в паренхиму ЦНС. Без протеолитической активности клетки иммунной системы попадают в периваскулярное пространство, разделяющее слои базальной мембраны [15]. В любом случае металл-зависимые протеазы облегчают проникновение активированных клеток иммунной системы в паренхиму ЦНС, а уровень этих протеаз регулируется кластером дифференциации 147 (CD147) [16]. Перед попаданием в паренхиму ЦНС Т-клетки могут реактивироваться повторно благодаря новой презентации антигенов АПК (микроглией, макрофагами, В-клетками и дендритными клетками). Продукты секреции активированных клеток иммунной системы включают в себя свободные радикалы, протеазы, цитокины, которые вызывают повреждения и гибель клеток ЦНС [17, 18].

За начальным повреждением следует проникновение антигенов ЦНС в лимфоузлы, которое способствует активации Т-клеток и других подклассов иммунных клеток, которые затем проникают в ЦНС. Таким образом, даже если причина развития РС и остается неизвестной, то результат всегда один – это активация и увеличение количества иммунных клеток в ЦНС, которые затем приводят к демиелинизации, аксональному/нейрональному повреждению и гибели олигодендроцитов – знаковым симптомам РС [19]. При этом лабораторией Дэвида Хафлера на примере Т-клеток специфичных к ОБМ и ПЛП (протеолипидный протеин), было показано, что в принципе потенциальные аутореактивные лимфоциты присутствуют не только у больных РС, но и в норме у здоровых людей, правда в неактивированном состоянии [20]. Очевидно, что для активации Т-клеток необходима презентация антигенов. Обычно патоген в поврежденных тканях захватывается и разрушается антиген-презентирующими клетками (АПК) – чаще всего дендритными клетками. Далее АПК мигрируют в лимфоузлы, неся небольшую часть патогена – антиген, связанный с ГКГС на поверхности

клетки. В лимфоузлах антиген презентруется наивным Т-клеткам, таким образом, что клетки с Т-клеточными рецепторами (ТКР), узнавшими комбинацию антиген/ГКГС, становятся первично активированными. Следующий сигнал опосредованный ко-стимулирующими молекулами (например, В7 - на АПК и CD28 на Т-клетках) необходим для дальнейшей активации, пролиферации и последующей дифференциации в эффекторные клетки. CD8<sup>+</sup> Т-клетки активируются через взаимодействие ТКР с антигеном в комплексе с ГКГС I класса, а CD4<sup>+</sup> клетки через взаимодействие с комплексом антигена с ГКГС II класса. CD4<sup>+</sup> Т клетки особенно интересны в патологии РС, так как они могут дифференцироваться в провоспалительные Т-хелперы 1 и 17, противовоспалительные Т-хелперы 2, или в Т-регуляторные клетки в зависимости от микроокружения и стимулирующих цитокинов [21]. У больных РС CD4<sup>+</sup> Т-клетки имеют тенденцию к дифференциации в Т-хелперы 1 и/или 17, которые являются не только провоспалительными, но даже потенциально и нейротоксичными [17]. Цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-клетки наряду с CD4<sup>+</sup> так же могут активно участвовать в разрушении ЦНС при РС [22].

С конца 80-х годов прошлого века в мировом научном сообществе развивается теория о иммунной регуляции воспалительных процессов путем регуляции баланса Т-хелперов. Из этой теории следует, что развитие заболевания может зависеть от баланса между Th1 и Th2 цитокинами. Известно, что эти цитокины способны ингибировать друг друга, и поэтому очень важно, какое направление примет иммунный ответ (Th1 или Th2). Считается, что РС является заболеванием, индуцированным клетками типа Th1. Но до сих пор это утверждение нельзя назвать однозначным из-за ряда опровергающих работ [23, 24]. На сегодняшний день главенствует гипотеза, по которой Th1 клетки и их функционирование связано с продукцией ИФН- $\gamma$  и в меньшей степени ИЛ-12, ИЛ-2 и ФНО- $\alpha$ . Th2 клетки наиболее сопряжены с продукцией ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-10. Было показано, что Th2/Th1 баланс, определенный по уровню цитокинов, у пациентов с РС после курса лечения глатимер ацетатом или Натализумабом [25] сместился в сторону Th2 ответа.

Так же было показано, что Авонекс, Ребиф и Бетаферон уменьшают уровень ИФН- $\gamma$  и ингибируют его влияние [26, 27].

Во время развития РС концентрация различных цитокинов в крови может значительно варьироваться. Было показано, что уровень экспрессии многих генов в лимфоцитах периферической крови (PVMCs) сильно изменяется по сравнению со здоровыми контролями, и многие из этих генов тем или иным образом связаны с иммунной функцией, включая ИФН- $\gamma$ , ЛТВ, ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$  и другие члены суперсемейства ФНО [28]. Любопытно, что сначала ФНО считался возможным участником воспаления РС [29], но в последнее время было показано, что ФНО скорее является противовоспалительным цитокином при аутоиммунной демиелинизации [30, 31], и его экспрессия подавляется при развитии РС [28]. При клинических исследованиях препаратов, ингибирующих синтез ФНО- $\alpha$ , была показана вероятность увеличения риска развития РС [32, 33]. Дополнительными доказательствами влияния ФНО- $\alpha$  на патогенез РС могут служить эксперименты, показывающие, что укороченный рецептор ФНО- $\alpha$  1 с двумя остатками “А” вместо двух “G” увеличивает вероятность развития РС на 12% из-за схожести с эффектом лекарств, блокирующих ФНО- $\alpha$  [34, 35]. Необходимо заметить, что в ЦСЖ (но не в сыворотке) больных РС уровень ФНО- $\alpha$  значительно повышен и коррелирует с тяжестью и развитием заболевания [36]. Так же в других работах, посвященных изучению транскриптома в периферических лимфоцитах, было показано, что уровень экспрессии ИЛ-8 заметно повышен у пациентов с РС и при некоторых других аутоиммунных заболеваниях [37], что совпадает и с повышенным уровнем ИЛ-8 в ЦСЖ больных РС [38]. Изучение связи между профилем продукции цитокинов и тяжестью РС [39] выявило, что концентрация ИЛ-6 увеличена у больных, и разница становится ощутимее при увеличении тяжести заболевания, но уменьшается при наличии активных очагов воспаления. Уровень ИЛ-10 так же повышен у больных РС, однако не наблюдается никакой корреляции с тяжестью течения. ИФН- $\gamma$  в целом повышен, и разница более заметна при увеличении тяжести заболевания и наличии активных

бляшек. Уровень ФНО- $\alpha$ , наоборот, понижен, особенно при наличии свежих очагов воспаления. Остальные цитокины согласно большинству работ находятся примерно на одинаковом уровне со здоровыми контролями. Таким образом, несмотря на то, что для однозначной ассоциации РС с Th1 клетками необходимы дополнительные подтверждения, по уже имеющимся данным можно сказать что баланс Th1/Th2 оказывает значимое влияние на развитие РС.

## 1.2 Роль В-клеток в развитии и патологии рассеянного склероза

В-клетки так же несомненно вносят ощутимый вклад в развитии РС. Список потенциальных аутоантигенов при РС постоянно расширяется и включает в себя различные белки, ассоциированные с мембраной олигодендроцитов. Среди них особо выделяют основной белок миелина (ОБМ), протеолипидный белок (PLP1) и миелин-олигодендротарный гликопротеин (МОГ). Иммуноглобулины детектируют в ЦСЖ больных РС, а В-клеточные фолликулярные структуры обнаружены в мягких мозговых оболочках многих пациентов с РС [40]. При этом в сыворотке больных РС, а также мышей линии SJL с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом – моделью РС, обнаружены даже каталитические антитела к ОБМ, которые не только связывают, но и гидролизуют его [41, 42]. Хотя антитела сами по себе и не вызывают воспаление ЦНС, после повреждения гематоэнцефалического барьера (к примеру после Т-клеточного воспаления) – антитела могут мигрировать в ЦНС и усугублять развитие патологии [43, 44]. Было показано, что по крайней мере у части пациентов IgG участвуют в разрушении тканей, и подобные демиелинизирующие антитела были обнаружены в сыворотке крови больных РС [45]. Кроме продукции антител, нацеленных на компоненты ЦНС, таких например, как белки на перехватах Ранвье [46], патогенная роль В-клеток связана и с их клеточными функциями, такими как презентация антигенов, обеспечение помощи Т клеткам [47] и продукция ряда провоспалительных цитокинов [48] (**Рис.2**). В то же время В-

клетки являются источником и ингибиторных цитокинов, таких как ИЛ-10 или TGF- $\beta$  (Трансформирующий ростовой фактор бета). Таким образом, в зависимости от внешних сигналов В-клетки могут продуцировать про- или против-воспалительные цитокины, и соответственно сдвигать аутоиммунную реакцию в обе стороны.

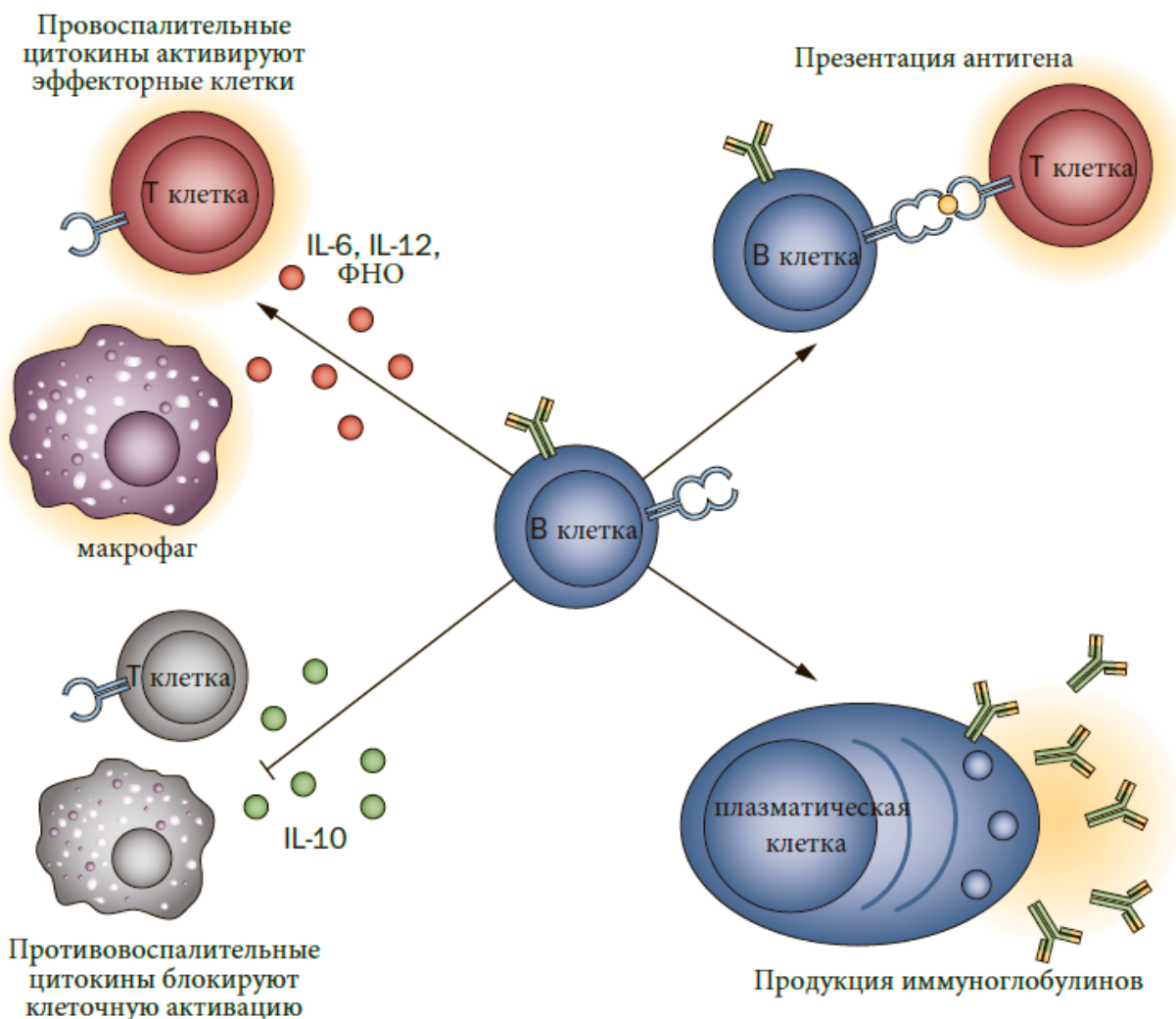


Рисунок 2. Роль В-клеток в иммунных процессах. Адаптировано из [49].

Одной из любопытных особенностей заболевания является наличие групп олигоклональных IgG (OGBs) в мозгу и ЦСЖ более чем у 90% больных РС [50]. Необходимо отметить, что данное наблюдение не является уникальной особенностью РС, так как OGBs так же обнаружены и при других хронических инфекционных заболеваниях ЦНС, таких как подострый склерозирующий лейкоэнцефалит (болезнь Ван-Богарта), нейросифилис (сифилис центральной нервной системы), менингит и другие. В каждом этом



случае олигоклональные IgG состоят из антител направленных против агента, являющегося причиной болезни [51], но в контексте РС конкретный антиген, против которого направлены олигоклональные IgG, достоверно неизвестен. В целом, роль В-клеток в аутоиммунных заболеваниях до конца не ясна. Неизвестно даже происходит ли нарушение толерантности В-клеток из-за дефектов молекулярных механизмов, вовлеченных в реарранжировку генов иммуноглобулинов, или из-за сбоев в процессе последующей селекции, так же определяющей итоговый антительный репертуар. Анализ частоты встречаемости переменных участков иммуноглобулинов у больных аутоиммунными заболеваниями по сравнению со здоровыми контролями на сегодняшний день выявил ряд небольших различий, но никакие из этих различий нельзя назвать главенствующими. Так же обнаружены нарушения в процессах положительной и отрицательной селекции, соматических мутациях. В дополнение к частоте встречаемости генов Ig V в определенных органах и тканях было выявлено, что клональная амплификация В-клеток четко компартментализована и ограничена набором антигенов в этих тканях [52]. Цхангом с соавторами были описаны В-клетки из цереброспинальной жидкости больных РС (2 пациента), которые, по всей видимости, претерпели антиген-направленную соматическую гипермутацию в герминативных центрах вторичных лимфоидных органов и подверглись клональной амплификации в ЦНС [53]. Для антител, полученных из этих В-клеточных клонов, было показано связывание с различными типами аксонов в местах их повреждения на срезах мозга больных РС. Причем, связывание происходило только в областях повреждения и соседних с ними. У здоровых людей и больных другими заболеваниями (болезнь Паркинсона) окрашивания гистохимических срезов описанными антителами не наблюдалось. Это позволяет сделать предположение о существовании антигенов, экспрессирующихся или меняющих свою конформацию только при воспалении миелиновой оболочки, которое и инициирует активацию соответствующих В-клеток и дальнейшее разрушение миелина. Таким образом, какое-либо нарушение в ЦНС может привести к презентации новых

фрагментов антигенов и инициации воспаления так как многие белки в здоровой миелиновой оболочке скрыты и не экспонированы на поверхности. Аналогично факт миграции В-клеток в ЦНС у больных РС был доказан группой Мейера [54]. Авторами было показано окрашивание миелиновой оболочки антителами только в областях повреждения, но выявить конкретный антиген так же не удалось.

Для однозначного прояснения роли антител в развитии заболевания применяют критерий Витебски-Роз-Коха [55], в соответствии с которым аутоантитело считается патогенным, если 1) введение (перенос-трансфер) этого антитела вызывает заболевание, 2) аутоантитело может быть найдено в очагах развития, специфических именно для этого заболевания, 3) заболевание может быть индуцировано иммунизацией анти-идиотипическим антителом. Эти принципы являются вполне справедливыми, так как в целом В-клетки пациентов с аутоиммунными заболеваниями часто продуцируют аутоантитела к широкому спектру антигенов. Но для многих из этих антител пока не удалось определить, сколь они патогенны. В некоторых случаях даже антитела с одинаковой специфичностью обладают разным уровнем патогенности. Например, не все пациенты с системной красной волчанкой с наличием антител, специфичных к двуцепочечной молекуле ДНК развивают гломерулонефрит. Аналогично только некоторые из этих ДНК-специфичных антител способны индуцировать протеинурию после их введения экспериментальным животным [56]. На сегодняшний день эти критерии патогенности антител полностью не доказаны и не опровергнуты. Поэтому доказательство патогенности аутоантител к белкам миелиновой оболочки при РС в дальнейшем может помочь прояснить этиологию заболевания.

Как и было уже замечено выше, существует мнение, что основной ролью В-клеток в развитии аутоиммунных заболеваний в большей мере может являться не продукция непосредственно антител, а антиген-презентирующая способность. При этом эффективность презентации антигенов Т-клеткам и, соответственно, их активация может быть в десятки тысяч раз лучше, чем у дендритных клеток в случае подходящих антигенов [57]. Суммируя

вышесказанное, В-клетки могут играть возможно двойственную, но в любом случае заметную роль в патогенезе РС. В этой связи знание паратопа аутореактивного В-клеточного рецептора вкупе с его эпитопом может быть весьма перспективными для понимания механизмов развития заболевания, а также разработки новых подходов к терапии и диагностике РС.

### **1.3 Структурные особенности CDR и проблема кроссреактивности антител.**

Несмотря на то, что структура иммуноглобулинов давно известна, и нет никаких сомнений, что именно CDR отвечают за их особенности, до сих пор не ясно, какой именно домен отвечает за связывание антигена в наибольшей степени. Существуют данные, что для некоторых антигенов (антител) главную роль играют тяжелые цепи, а для других – лёгкие. Впервые фракция IgG была выделена в 1939 г. Тиселиусом и Кабатом. С тех пор многочисленные исследования их структуры и функций ставят все больше и больше новых вопросов. Известно, что IgG состоит из двух тяжелых и двух лёгких цепей. Считается, что паратоп формируется из переменных регионов тяжелой и лёгкой цепей, а точнее из 4 - 6 CDR (участков, определяющих комплементарность, англ. - complementarity-determining regions), которые образуют петли на конце каждого Fab-фрагмента. Так как длительное время господствовала теория, что структурно паратоп состоит в основном из CDR тяжёлой цепи, то большинство работ по созданию и улучшению антител фокусировались на изменении именно этих регионов [58, 59]. Но в некоторых случаях тяжелая и лёгкая цепи являются равноценными участниками в образовании контакта с антигеном [60, 61]. Существуют данные, что некоторые виды (верблюды [62] и усатые акулы [63]) не имеют лёгких цепей в принципе и используют только тяжелую цепь для узнавания антигена. Имеется ряд работ по попытке создания антител такого типа с одной цепью для их применения в терапии и диагностике [64]. На мышинных моноклональных антителах было показано, что тяжелая цепь узнает свой антиген (человеческий тиреоглобулин) в отсутствие лёгкой цепи, но с

аффинностью на порядок меньшей (в основном из-за увеличения  $k_{дис}$ ). При этом индивидуальная лёгкая цепь не способна связывать свой антиген [65]. Авторы предположили, что лёгкая цепь вовлечена в большей мере в стабилизацию, чем собственно в образование комплекса антитело-антиген, и, таким образом, специфичность в основном определяется тяжелой цепью. С другой стороны Кумар и соавторы [66] проанализировали связывание 9 Fab-фрагментов с ДНК и кардиолипином и определили, что их активность может определяться одной из двух цепей в зависимости от антигена: для ДНК связывания – лёгкой, а для связывания кардиолипина – тяжелой. В любом случае вторая цепь была необходима для наилучшего связывания антигена. Несколько позже были попытки определить относительный вклад тяжелой и лёгкой цепи в связывание полноразмерных антител к кардиолипину, путем перемешивания комбинаций цепей трех антител к кардиолипину и двух антител к ДНК [67]. В этом случае авторы предположили, что в основном тяжелая цепь играет роль в связывании как кардиолипина, так и ДНК.

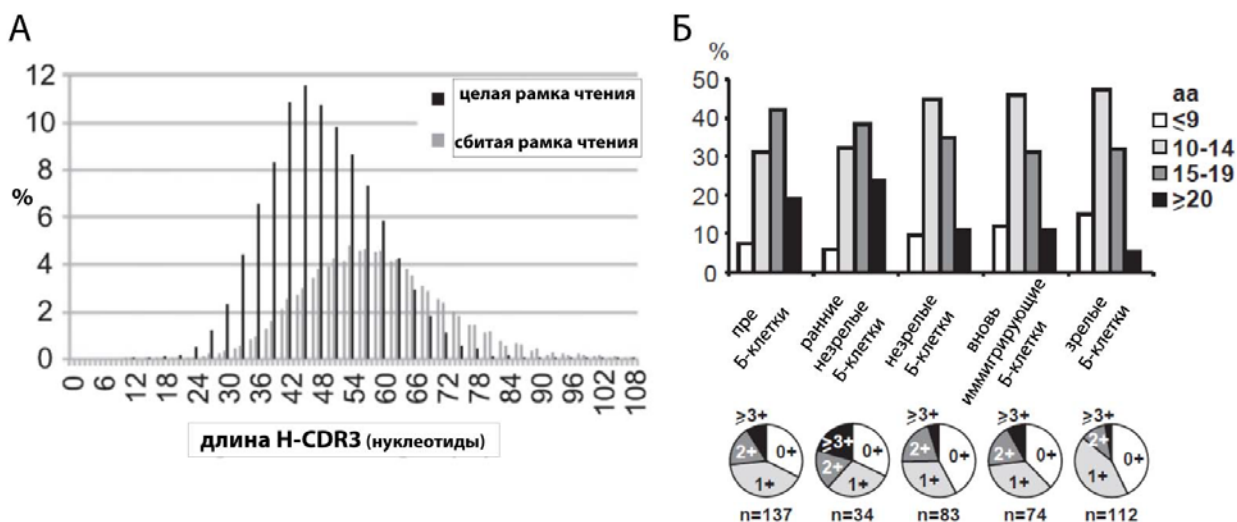
Мэй Сан и соавторы показали на примере хроматографически разделенных тяжелых и лёгких цепях, что VIP-специфичная (vasoactive intestinal polypeptide) аффинность лёгких цепей была только в 5 раз меньше, чем у исходных антител, с сохранением высокой специфичности и отсутствием связывания посторонних пептидов [68]. Исходя из этих наблюдений, можно предположить, что лёгкие цепи сами по себе уже содержат необходимые структурные характеристики для специфического связывания с высокой активностью. Перейра и соавторы [69] показали, что индивидуальная рекомбинантная лёгкая цепь даже без присутствия каких-либо тяжелых цепей обладает свойством связывать кардиолипин. Галин и соавторы исследовали панель моноклональных и поликлональных антител неизвестной специфичности, содержащих лёгкие лямбда х цепи, на связывание с ОБМ [70]. Все эти антитела были способны связывать ОБМ и при этом не обладали кроссреактивностью по отношению к другим аутоантигенам. Связывание с ОБМ индивидуальной рекомбинантной легкой лямбда х цепью наглядно подтверждает её важность в узнавании антигена.

Густав Де Сильва и соавторы используя метод сканирующего мутагенеза CDR лёгких цепей в комбинаторных библиотеках, смогли улучшить результирующую аффинность исследуемых антител [71]. Мауро Ашионе обнаружил, что соматические мутации в лёгких цепях изменяют термодинамику связывания и координацию воды в семействе антител НуHEL-10 [72]. Гопал Саппарапу описал специфический гидролиз рекомбинантного белка E2 вируса гепатита С антителами, содержащими тяжёлый переменный домен анти-E2 IgG и случайные каталитические VL домены [73]. Гибридный IgG гидролизовал E2 белок намного быстрее свободной лёгкой цепи. А так же получившееся гибридное антитело нековалентно связывало E2 методом. Таким образом, эта работа доказала принцип, что каталитическую активность свободной лёгкой цепи можно сделать высокоспецифичной, присоединив нековалентно связывающую тяжёлую цепь. В то же время были получены доказательства значимой роли лёгкой цепи иммуноглобулинов в узнавании антигена и селекции при хронической лимфатической лейкемии путем анализа паттернов соматических гипермутаций и вторичных перестроек, вовлекающих ген лёгкой цепи, в 725 больных с хронической лейкемией [74]. Суммируя эти противоречивые данные на сегодняшний день невозможно высказать единую теорию, объясняющую, какой же домен в большей степени ответственен за узнавание и связывание антигена.

О существовании природных антител, способных с умеренной аффинностью взаимодействовать с множеством, причем разнообразных и непохожих как собственных, так и чужеродных антигенов (таких как белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды, компоненты цитоскелета и полипептидные гормоны) в сыворотке здоровых людей известно давно [75]. Считается, что подобные антитела могут быть вовлечены в уничтожение клеточного дебриса и токсических субстанций [76]. Несмотря на то, что по аминокислотному составу антитела затруднительно предсказать его характеристики и наличие поли-реактивности, тем не менее длинные CDR3 тяжёлых цепей часто ассоциируются с поли- или аутореактивностью [77, 78]. Недавно появились данные, что в случае со значимо удлиненным CDR3 (более

21 а.о.) тяжелой цепи паратоп может состоять исключительно из петли этого CDR3 [79]. Такая структура носит название «головки молотка» («hammerhead»). Подобные антитела так же обладают повышенным уровнем кроссреактивности из-за уменьшенной площади участка взаимодействия антитело-антиген.

С аутореактивностью связывают и наличие положительно заряженных аминокислот в CDR3 тяжелой цепи [80]. На **рисунке 3** представлены среднее распределение по длинам CDR3 [81, 82] и заряду [82]. И несмотря на то, что почти все незрелые В-клетки (около 50-70%) поли- или ауто-реактивные, в пуле зрелых В-клеток только 5% сохраняют эту необычную форму реактивности [82, 83]. Тем не менее известно, что В-клетки могут заново восстанавливать поли- и ауто- реактивность в герминативном центре [84].



**Рисунок 3. (А) Распределение длин гипервариабельных участков (CDR3) тяжелых цепей человеческих иммуноглобулинов (из зрелых naïve В-клеток). Показаны данные для продуктивных антител (черные столбцы) и для вариантов со сбитой рамкой (серые столбцы), адаптировано из [81]. (Б) Распределение длин и зарядов гипервариабельных участков (CDR3) тяжелых цепей человеческих иммуноглобулинов в процессе созревания В-клеток, адаптировано из [82].**

Ауто-реактивность является характерным признаком сывороточных антител при нескольких инфекциях, включая HIV, EBV и гепатит С. Это наблюдение было впервые задокументировано в работе по изучению миелом почти 40 лет назад [85], но роль этого специфического взаимодействия с антигеном до сих пор до конца не ясна. В 2010 г. было показано, что от 59% до 82% антител к gp140 (ВИЧ) из организма больных являются

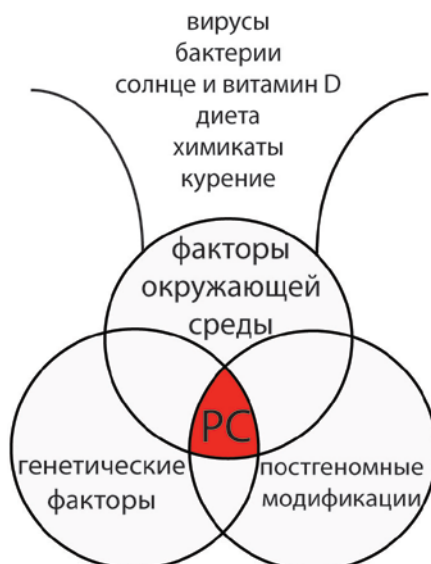
полиреактивными [86]. Авторы предположили, что эта полиреактивность может увеличивать суммарную аффинность к патогену, когда один паратоп антитела с высокой аффинностью будет связываться с gp140, тогда как второй с меньшей аффинностью с некоторыми другими лигандами на поверхности вируса. Недавно было показано, что такие отдельные клоны полиреактивных В-клеток могут активно пролиферировать в организме человека и составлять до 0.2% от всех циркулирующих клеток [87].

#### 1.4 Этиология рассеянного склероза

Несмотря на полуторавековую историю изучения РС потенциальный патоген, индуцирующий это заболевание, остается неизвестным. Тем не менее считается, что для развития РС обязательно наличие генетической предрасположенности, то есть лишь при определенном сочетании генетических и экзогенных факторов возможна хроническая активация иммунных клеток, приводящая к нейрональным повреждениям (**Рис.4**).

Генетический скрининг выявил несколько генов-кандидатов, среди которых наиболее значимым считается локус HLA (human leukocyte antigen) - как регион, наиболее ассоциированный с РС. Но и здесь нет однозначных соответствий – например, в северной Европе исторически была выявлена наибольшая связь РС с HLA-DR2 или HLA-DRB1\*15 [88, 89], а в другой части Европы (например, Сардиния) наибольшая ассоциация замечена с HLA-DRB1\*0301, HLA-DRB1\*0405 и HLA-DRB1\*1303 [90]. По другим данным обнаружены новые гаплотипы (*HLA-DRB1\*03*, *HLA-DRB1\*01*, *HLA-DRB1\*10*, *HLA-DRB1\*1*, *HLA-DRB1\*14* и *HLA-DRB1\*08*), коррелирующие с заболеванием как отрицательно так и положительно, но при этом сила эффекта может отличаться от случая к случаю [91-93]. Тем не менее достоверно установлено увеличение риска развития РС у родственников больного [94, 95]. При этом у ближайших родственников риск повышен примерно в 10–25 раз по сравнению с обычной популяционной выборкой. Работы по исследованию генома [34] и их анализ [96] выявили ряд других дополнительных генов с

определенным влиянием на риск развития РС, такие как альфа рецептор интерлейкина 7 (IL7RA), альфа рецептор интерлейкина 2 (IL2RA), CD58, один из суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNF RSF1A), IRF8 (interferon regulatory factor 8) и CD6. Но эти данные требуют дальнейшего изучения и подтверждения.



**Рисунок 4. Факторы, влияющие на развитие рассеянного склероза.**

Эпидемиологические исследования выявили несколько факторов риска РС, включая недостаток солнечного света (нехватка витамина D), контакты с вирусами и даже курение (**Рис.4**). На сегодняшний день эти факторы ассоциированы с предрасположенностью к развитию РС, однако недавние работы показывают, что некоторые из этих факторов могут так же влиять и на течение заболевания. Рядом авторов было показано, что у людей, много контактирующих с органическими растворителями, относительный риск заболевания увеличен с 1.7 до 2.6 [97]. В то же время у пациентов, которые раньше контактировали с растворителями или другими токсическими элементами, детоксикация, нацеленная на уменьшение концентрации ксенобиотиков в организме, может, вообще, замедлить или даже повернуть вспять процесс демиелинизации [98]. В любом случае очевидно, что выявление факторов окружающей среды, способствующих развитию РС, является очень сложной задачей, так как по отдельности ни один из них не может быть необходимым и достаточным для развития заболевания. Наиболее



вероятным представляется, что одновременное и множественное взаимодействие этих факторов и определяет предрасположенность к РС, а так же и его течение. Для корректной оценки всех этих факторов риска необходимы обширные выборки с достоверными данными. Например, известно, что диета может играть довольно значимую роль в возникновении РС. Несколько исследователей показали, что приступы РС могут быть вызваны аллергическими реакциями на пищу [99, 100]. Исключение проблемных продуктов из рациона приводит к симптоматическому улучшению, а их возобновление – к обострениям.

### **1.5 Вирусное влияние на развитие Рассеянного Склероза (Инфекционные факторы окружающей среды)**

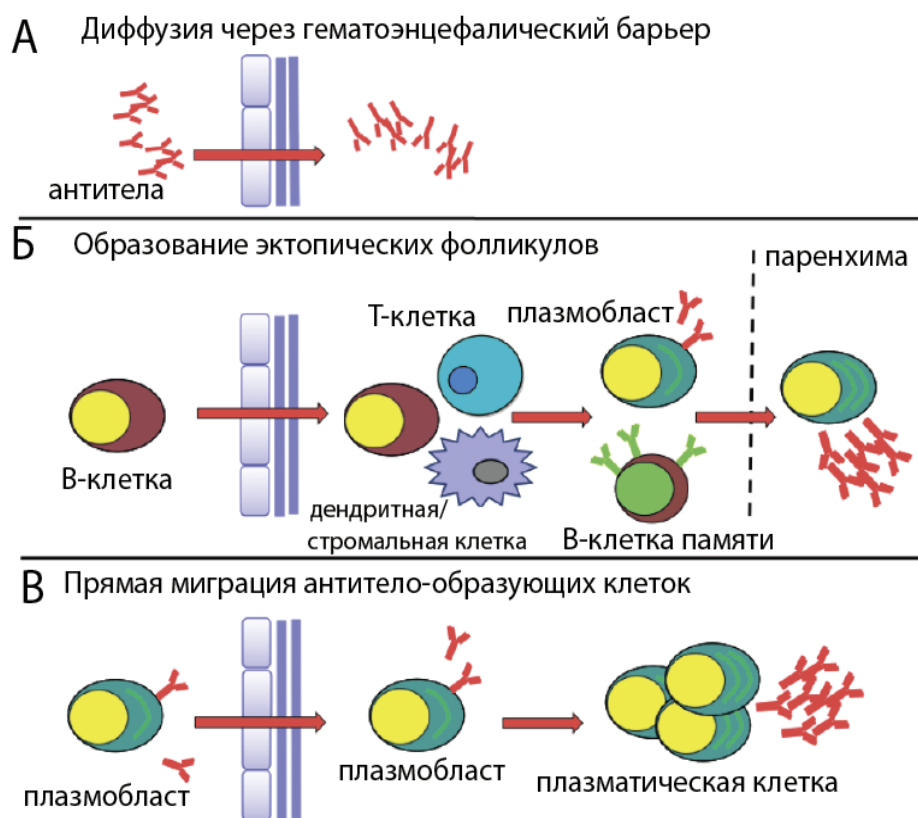
Исследования последних 20 лет выявили увеличенную восприимчивость к рассеянному склерозу у людей, переболевших инфекционным мононуклеозом, симптоматической инфекцией человеческого гамма-герпевируса - вируса Эпштейн-Барр (ВЭБ), а так же рядом других патологий вирусной и бактериальной природы. С самого открытия РС предполагалось, что инфекции играют основополагающую роль в иницировании заболевания. Это предположение привело к появлению первого одобренного FDA иммуномодулирующего лечения РС, интерферона-бета (ИФН-б) - известного своей противовирусной активностью. Пьер Мари, студент Джен-Мартина Чаркота, который первый описал рассеянный склероз с клинической точки зрения в 1868 г [101], усердно доказывал, что инфекционные патогены, или что более вероятно, объединенные инфекции иницируют РС [102]. Эта гипотеза была сформирована во времена «золотой эры» микробиологии и весьма вероятно, что на её появление повлияли выдающиеся открытия источников множества инфекционных заболеваний такими исследователями, как Льюис Пастер и Роберт Кох.

По современным представлениям один из возможных механизмов вирусной индукции РС можно описать следующим образом: за острой вирусной инфекцией (или иммунизацией) антиген в лимфо-узлах индуцирует

пролиферацию нативных В-клеток и их миграцию в экстрафолликулярные центры или лимфоидные фолликулы [103, 104]. Экстрафолликулярные В-клетки, которые дифференцируются в коротко-живущие антитело-образующие клетки, обеспечивают ранний источник низко-аффинных антител. А часть В-клеток, мигрировавших в лимфоидные фолликулы в ответ на сигнал CXCR5 с цитокином CXCL13 и CCR7 с лигандами CCL19 и CCL21, формирует герминативный центр (ГЦ). Фолликулярные дендритные клетки сохраняют поверхность антигена неврежимой и презентуют его В-клеткам, проникающим в ГЦ [105]. Далее фолликулярные дендритные клетки поддерживают образование ГЦ секрецией CXCL13 (главного хемоаттрактанта В- и Т-клеток фолликулярных помощников (Т<sub>F</sub>H) ГЦ) а так же ИЛ-6 и BAFF (В-клеточный активирующий фактор). ИЛ-21, продуцируемый Т<sub>F</sub>H-клетками, создаёт Т-клеточную популяцию, необходимую для существования ГЦ, а так же обеспечивает регуляцию созревания и распространения В-клеток ГЦ [106, 107]. Эти процессы в ГЦ ведут к дальнейшей дифференциации В-клеток по 2 двум путям: антитело-образующие клетки (ASC) и В-клетки памяти не секретирующие антитела (В<sub>пам</sub>) [108]. Для подавления инфекции антитело-образующие клетки выходят в кровотоки и дают начало долгоживущим плазматическим клеткам (ПК), находящимся преимущественно в костном мозге [103, 104]. Антитело-образующие клетки содержат в себе фенотипически и функционально гетерогенную популяцию В-клеток уже встречавшихся с антигеном и направленных на продукцию антител; это и пре-ПК, экспрессирующие ГКГСII, и конечные неподвижные и неделящиеся ПК, направленные на высокую постоянную продукцию антител. Эти неподвижные долгоживущие ПК в костном мозге и обеспечивают защитную продукцию антител при повторной инфекции, при этом оценочное время полу-жизни антивирусных ответов антитела у человека варьируется от 10 до 50-200 лет для разных вирусных агентов [109]. Несекретирующие В-клетки памяти по большей части остаются в лимфоидных органах, но так же могут быть обнаружены и в кровотоке. И при повторной встрече с антигеном происходит

быстрая трансформация в антитело-образующие клетки двумя способами: зависимо от ГЦ и независимо от него [110, 111].

Антитело-образующие клетки обнаружены не только в лимфоидных органах, но и в слизистых тканях, а так же и в ЦНС при различных инфекционных состояниях [103, 104, 112-114]. Более того, экспрессия CXCL13 и CCL19/21 в ЦНС и других нелимфоидных органах может приводить к формированию эктопических фолликул-подобных структур, содержащих множество дифференцирующихся вариантов В-клеток [115, 116]. Продукция антител в подобных структурах скорее всего как раз и влияет на В-клеточную экспансию и локальные гуморальные ответы. Источник антител и антитело-образующих клеток в ЦНС в течение или после вирусного энцефалита до сих пор точно не известен (**Рис.5**). Непосредственное проникновение антител из сыворотки кажется малоэффективным из-за гематоэнцефалического барьера. Соотношение между антителами из ЦСЖ и сыворотки варьируется в пределах 1:200 – 1:500 в ЦНС здоровых людей [117, 118], и увеличивается только когда целостность гематоэнцефалического барьера нарушена. По этой причине антитело-образующие клетки в ЦНС являются более эффективным и стабильным источником антител. Эти клетки могут образовываться из эктопической фолликулярной структуры в ЦНС и/или через прямую миграцию антитело-образующих клеток, активированных ещё на периферии [119]. После чего антитела, первично образованные на вирусные антигены, начинают взаимодействовать с собственными кроссреактивными аутоантигенами в ЦНС, вызывая локальные воспаления и в дальнейшем развитие заболевания.



**Рисунок 5. Различные схемы образования антител в ЦНС (при относительно неповрежденном ГЭБ). Адаптировано из [119].**

В итоге с момента открытия заболевания был создан длинный список потенциальных инфекционных триггеров РС. Некоторые из них, которые получили наибольшее внимание за последние годы, будут обсуждены ниже.

### **1.5.1 Вирус Эпштейн-Барр**

Среди большого списка предложенных патогенов, включая различные герпесвирусы, вирус ветряной оспы, человеческие эндогенные вирусы, вирус Торке тено, хламидию и прочие бактериальные агенты, вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) заслужил наиболее пристальный научный интерес на сегодняшний день. В развитых странах около 50% популяции приобретают ВЭБ от 1 до 5 лет после рождения, в остальных случаях им заражаются в основном в период полового созревания [120]. У 30-50% людей, которые приобрели вирус на втором десятке жизни или позже, развивается симптоматическая инфекция, известная как инфекционный мононуклеоз (ИМ), который характеризуется железистой лихорадкой и массовым распространением вирус-специфичных Т-

лимфоцитов, которые затем опять убывают по окончании инфекции [120]. В связи с улучшением санитарных условий в развитых странах люди всё чаще приобретают ВЭБ с возрастом.

Ряд работ поддерживает теорию ассоциации ИМ с увеличенным риском развития РС [121-123]. Основанный на недавно обновленных мета-анализах, оценивающих 18 клинических работ, риск развития РС после ИМ был определен как 2,17 [124], в то время как риск РС у людей, имеющих HLA-DRB1\*15, и переболевших ИМ, возрастает в семь раз [125]. Множество эпидемиологических работ за последние 30 лет выявили, что практически все пациенты с РС (95.5%), имеют положительную серологическую реакцию на инфекцию ВЭБ, когда здоровые имеют положительную серологическую реакцию только в 94.2% [126]. Эта разница ещё больше выражена в педиатрических случаях РС, где 83% имеют положительный ответ, в то время как у здоровых он составляет всего 42%. Никаких значительных различий для остальных вирусов, таких как цитомегаловирус, парвовирус B19 и вирус ветряной оспы, обнаружено не было [127].

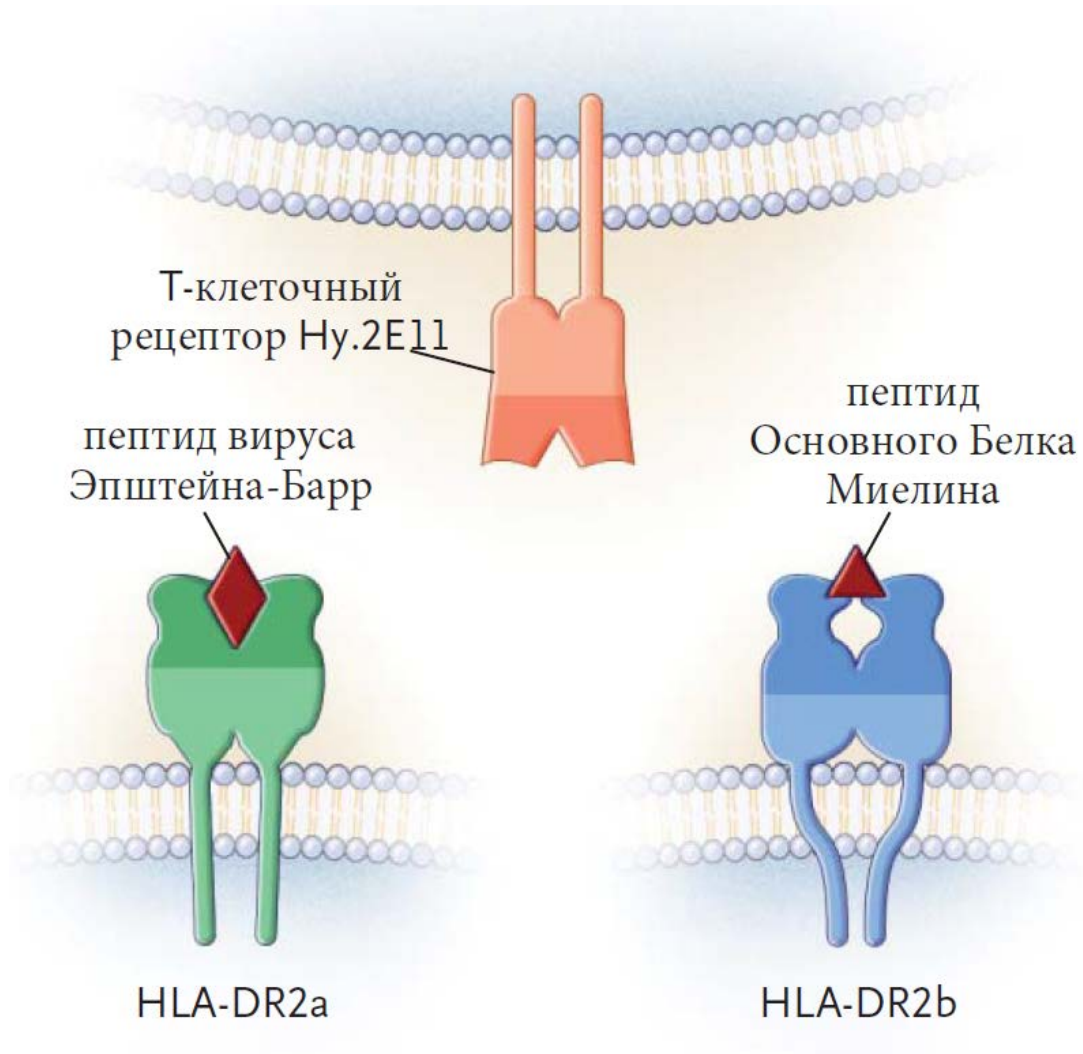
Левин с соавторами проанализировали более 3 миллионов образцов крови личного состава армии США за 12 лет [128]. Авторами было выявлено, что четырехкратное увеличение антител к ядерным антигенам ВЭБ (EBNA) коррелирует с трехкратным увеличением риска развития РС. Никаких подобных связей с титром антител к цитомегаловирусу замечено не было. Стоит заметить, что у больных РС по сравнению со здоровыми титр антител к ядерному антигену 1 (EBNA-1) повышается в 2-3 раза только после достижения 25-летнего возраста. Никакой корреляции между возрастом или силой ИМ с риском РС обнаружено не было [129, 130]. Похожие наблюдения были сделаны Де-Лоренцом и соавторами, которые собирали образцы крови больных РС за 30 лет до развития болезни, и детектировали значимое увеличение иммуноглобулинов G, специфичных к ядерному антигену 1 ВЭБ, по сравнению со здоровыми контролями. Однако в этой работе увеличение титра анти-EBNA IgG обнаружилось за 15-20 лет до развития болезни [131]. У пациентов с клинически изолированным синдромом образование антител к

ядерному антигену 1 увеличивалось по сравнению со здоровыми носителями ВЭБ, что использовалось как предсказание к переходу на клинически диагностируемый РС [132].

Ядерный антиген 1 является единственным антигеном ВЭБ, который постоянно экспрессируется в пролиферирующих В-клетках памяти, зараженных ВЭБ. Считается, что CD4+ Т-лимфоциты играют важную роль в иммунном контроле постоянной инфекции ВЭБ. Для CD4+ Т-лимфоцитов, специфичных к ядерному антигену 1, но не для Т-клеток, специфичных к другим литическим или латентным пептидам ВЭБ и цитомегаловируса, было замечено увеличение пролиферативной способности и усиленная секреция интерферона гамма. В то время как CD4+ Т-лимфоциты здоровых носителей ВЭБ предпочтительно узнают однотипные эпитопы внутри центральной части иммуногенного домена ядерного антигена 1, для пациентов с РС было показано значительно повышенные уровни CD4+ Т-клеток, специфичных к ядерному антигену 1 с сильно возросшим количеством эпитопов внутри этого региона [133].

Есть несколько гипотез, объясняющих, как вирусные инфекции связаны с РС. Одна из них - bystander activation – согласно которой аутореактивные клетки активируются неспецифическими воспалительными молекулами во время инфекции, такими как цитокины, суперантигены или лиганды толл-подобных рецепторов [134]. По другой гипотезе активация клеток иммунной системы вирусами происходит через процесс «молекулярной мимикрии» [135]. При этом комплекс патоген/ГКГС имеют конформацию на АПК схожую с комплексами эндогенных пептидов, например, таких как фрагменты ОБМ (**Рис.6**). Если костимулирующие молекулы совпадут определенным образом, то произойдет дифференциация не только патоген-реактивных Т-клеток (правильный иммунный ответ), но и появление ОБМ-реактивных Т-клеток (неправильный иммунный ответ). Далее оба пула клеток дифференцируют в Т-хелперы 1 или 17, затем опять реактивируются в ЦНС и, тем самым, вызывают патологию. В поддержку этой идеи свидетельствует факт кроссреактивности Т-клеток, изолированных из больных РС, между ОБМ и

антигенами коронавируса [136] или ВЭБ [137]. Более того, анализ кристаллической структуры выявил значительное сходство между комплексом *DRB5\*0101*-EBV и *DRB1\*1501*-ОБМ, что делает возможным их узнавание одним и тем же Т-клеточным рецептором [138] (**Рис.6**). Некоторые



**Рисунок 6. Модель молекулярной мимикрии. Кросс-узнавание чужеродных пептидов ВЭБ и собственного ОБМ в комплексе с молекулами ГКГС. Адаптировано из [139].**

исследователи предполагают, что молекулярная мимикрия позволяет Т-клеткам, специфичным к ядерному антигену 1, путем кроссреактивности узнавать собственные антигены, что в конечном счете приведет к инициации и дальнейшему развитию аутоиммунных патологий. В поддержку этой гипотезы было показано, что у пациентов с РС селективно увеличен Т-клеточный ответ к ядерному антигену 1, а так же чаще встречается узнавание миелиновых антигенов по сравнению с другими аутоантигенами, не связанными с РС [140].

Другой гипотетический механизм вовлеченности ВЭБ в РС основан на его способности инфицировать и иммортализовывать В-клетки. При этом вирусные белки имитируют сигналы, необходимые для выживания В-клеток [141]. Возможно предположить, что ВЭБ может инфицировать и тем самым поддерживать в жизнеспособном состоянии аутореактивные В-клетки, которые влияют на патологию заболевания. В работах Серафини показано, что постмортальные образцы мозга пациентов с РС, но не пациентов с другими воспалительными болезнями ЦНС, содержат значимое количество В-клеток, зараженных ВЭБ и продуцирующих вирусные антигены [142]. К сожалению, эти наблюдения не подтвердились в работах других авторов [143, 144]. Таким образом, необходимы дальнейшие эксперименты для прояснения точных молекулярных механизмов, которые приводят к ассоциации ВЭБ с РС.

### ***1.5.2 Человеческий вирус герпеса 6***

Другой повсеместно распространенный герпесвирус, возможно связанный с РС, – это человеческий вирус герпеса 6 (HHV-6). Он характеризуется латентными фазами и реактивацией, которые похожи на рецидивно-ремитирующий РС. Вирус имеет нейротропный потенциал и может инфицировать олигодендроциты и клетки микроглии [145]. При этом инкубационный период происходит в тканях ЦНС, которые служат резервуаром для постоянной инфекции [146]. Другой аспект, укрепляющий гипотезу вовлечения вируса в РС, состоит в том, что HHV-6 может привести к суровым неврологическим осложнениям, таким как энцефалиты и эпилепсия. Кроме того, способный заражать нейральные клетки HHV-6 чаще инфицирует Т-лимфоциты и по общему мнению приводит в действие модуляторные эффекты на иммунную систему [147]. HHV-6 был найден в сыворотке, цереброспинальной жидкости и в поврежденных тканях мозга при РС [148, 149], что, однако, опровергается в других работах [150]. Кроме прямого цитопатического (относящегося к заболеванию клетки) эффекта другие предполагаемые механизмы вовлечения HHV-6 в патологию РС включают в себя "сопутствующую активацию" (bystander activation) и молекулярную



мимикрию, из которых последняя получила неоспоримые доказательства. Основной белок миелина – предполагаемая эндогенная мишень при РС – имеет гомологичную последовательность с белком U24 вируса HHV-6. Число кросс-реактивных Т-клеток, отвечающих на пептиды ОБМ и U24, увеличено у пациентов с РС по сравнению с контролями [151]. В заключение стоит отметить, что до сих пор не существует эпидемиологического доказательства, что симптоматическая инфекция HHV-6 увеличивает риск развития РС [152].

### ***1.5.3 Вирус ветряной оспы***

Вирус ветряной оспы (HHV-3) встречается примерно у 95% взрослого населения. Инкубационный период вируса проходит в дорзальных ганглиях [153]. Это возбудитель болезни ветрянки, который изредка приводит к симптоматической реактивации, известной как опоясывающий лишай [154]. Многочисленные эпидемиологические работы продемонстрировали связь между вирусом ветряной оспы и РС, тем не менее, мета-анализ, включающий 40 отчетов с 1965 по 1999 не выявили удовлетворительного доказательства подобной ассоциации [155]. Присутствие ДНК вируса ветряной оспы было задокументировано в клетках крови [156] и цереброспинальной жидкости [157] пациентов с рецидивным РС. Кроме того, Сотело с соавторами с использованием электронной микроскопии обнаружил изобилие вирусных частиц, идентичных вирусу ветряной оспы в цереброспинальной жидкости больных РС в течение начальных дней рецидива заболевания [158]. Однако, когда группа Бургона использовала идентичный электронный микроскоп и технику ПЦР (полимеразно-цепной реакции), им не удалось выявить присутствие вирусных частиц или ДНК в цереброспинальной жидкости РС или в острых бляшках РС [159]. Неубедительные эпидемиологические данные и несоответствие в наблюдениях ставят связь между вирусом ветряной оспы и РС под сомнение.

### ***1.5.4 Вирус Торке Тено***

Соспедра и соавторы определили специфичность клонально пролиферирующих Т-клеток из цереброспинальной жидкости пациентов с РС

во время обострения. По результатам их наблюдений клоны Т-клеток узнавали эволюционно консервативные аргинин-богатые мотивы функциональных доменов вируса Торке Тено (ТТВ) [160]. Авторы рассуждают, что повторная случайная встреча обоих патогенных и непатогенных инфекционных агентов может привести к распространению ответа Т-клеток на постоянные домены белка, которые способны к кросс-реакции с собственными антигенами. Нехватка данных по ассоциации инфекции ТТВ и РС делают их связь слабо определенной.

### **1.5.5 Цитомегаловирус**

Другой вирус из семейства *Herpesviridae* распространен по всему миру и заражает от 45% до 100% населения, несколько преобладая у женщин [161]. Интересно, что для этого вируса ещё в 1983 была показана отрицательная корреляция между РС и CMV – при наличии повышенного титра в крови антител к цитомегаловирусу вероятность развития РС уменьшается [162]. Дальнейшие работы [163, 164] в основном подтвердили эти наблюдения. Авторы обнаружили слабую связь между *HLA-DRB1\*15* и CMV, но эти данные требуют дальнейшего подтверждения. Есть предположение, что EBV и CMV конкурируют за иммунный ответ, таким образом, получив решающее преимущество, один из вирусов оттягивает на себя значимую часть потенциала иммунной системы, а на второй почти не остается ресурсов. И хотя значимую разницу в титре антител к EBNA1 между CMV серонегативными и серопозитивными образцами зарегистрировать не удалось, наблюдается тенденция к уменьшению серопозитивности к CMV в случаях с высоким содержанием IgG к EBNA1. Было замечено, что титр сывороточных антител к цитомегаловирусу у больных РС коррелирует с уменьшением времени до первой ремиссии и увеличением самого количества этих ремиссий [165]. Группой авторов было обнаружено, что повышенные титры анти-CMV IgG совпадали с благоприятной клинической картиной и результатами магнитно-резонансной томографии у больных РС [163]. Ко-инфекция с мышинным CMV (MCMV) ослабила течение заболевания на модели мышинного вирусного

энцефалита Тейлера (модель для РС), увеличив моторику, и частично уменьшив атрофию мозга. Аналогично MCMV обладал иммуномодуляторными эффектами, уменьшая количество CD3+/CD4+ клеток в мозге [166]. На примере цитомегаловируса была показана и молекулярная мимикрия между вирусным пептидом и МОГ, но ЭАЭ при этом индуцировать им не удалось [167].

### ***1.5.6 Вирус простого герпеса***

Вирус простого герпеса – представитель ДНК-вирусов подсемейства Alpha-herpesvirinae Herpesviridae размером 110-120 нм. Он амплифицируется в ядрах и цитоплазме инфицированных клеток. Инфекция обычно имеет место в течение первых лет жизни, проходя в латентной форме и без симптомов, единственным следствием которой остается наличие вируса в ганглии тройничного нерва на протяжении всей жизни носителя [168]. Известно, что вирус может мигрировать от периферических ганглиев в височные доли головного мозга, вызывая энцефалиты [169]. 70-80% пациентов с РС имеют повышенный титр антител к HSV типа I. Были предприняты попытки обнаружить антитела к HSV и в ЦСЖ, но полученные различия были малодостоверными – 2.1% у больных РС против полного отсутствия у здоровых [170]. Работа американских патологоанатомов, проведенная на тканях мозга больных РС, подтвердила наличие вируса в очагах демиелинизации в 37% случаев, в 32% случаев в демиелинизирующих бляшках было подтверждено наличие другого типа вируса простого герпеса человека – 6А [170-172]. Данный вирус, в свою очередь, относится к подсемейству Betaherpesvirinaevirus с размерами 160-210 нм, и так же считается одним из ко-факторов в развитии РС, особенно в процессе ремиссии.

### ***1.5.7 Человеческий эндогенный ретровирус (HERV)***

Семейства эндогенных ретровирусов присутствуют в человеческой ДНК, очевидно попав в зародышевые линии клеток большинства

млекопитающих миллионы лет назад. Впервые описание этого вируса в контексте РС было сделано в лептоменингеальных LM7 и клеточных культурах макрофагов, изолированных из ткани больных РС [173]. В ряде недавних работ человеческий эндогенный ретровирус (HERV)-W был признан возможным патологическим началом в развитии РС [174], его присутствие в сыворотке и ЦСЖ больных было определено с помощью ПЦР в реальном времени [175]. Независимые исследования больных РС так же свидетельствуют о связи HERV-W с РС [175], включая стадии от рецидивно-ремиттирующей до прогрессирующих [176]. В свою очередь, эти эпидемиологические данные были подтверждены исследованиями, в которых была показана иммунопатогенность HERV-W вирионов, так как белок его оболочки (ENV) ответственен за основные про-воспалительные эффекты и является по сути суперантигеном, т.е. способен вызывать массовую неспецифическую активацию Т-лимфоцитов. Основываясь на этих данных, можно предположить, что аутоиммунный ответ, индуцированный базальной или взрывной экспрессией ENV, вносит определенный вклад в патологический механизм развития РС [177, 178]. ENV был обнаружен в бляшках РС в пост-натальных исследованиях [179] и согласно некоторым работам вызывает спонтанную активацию врожденного иммунитета через Toll-like Receptor-4 (TLR4) и CD14 [177, 178].

Как уже упоминалось ранее, в контексте более глубокого понимания РС необходимо знание структур потенциальных патогенных антител, которые могут возникать в организме вследствие процессов молекулярной мимикрии с участием вирусов или бактерий. Скрининг комбинаторных библиотек антител представляется наиболее оптимальным методом для установления взаимно-однозначного соответствия между структурой и функцией таких антител. Рассмотрим подробнее существующие методики конструирования подобных библиотек.

## 2. Комбинаторные библиотеки

В 1980-х необходимость быстрого и дешевого синтеза огромного числа химических соединений способствовала появлению нового направления, известного как комбинаторная химия (синтез различных соединений в одно время, в отличие от традиционного синтеза, где каждое вещество получают индивидуально). Методы комбинаторных библиотек изначально применялись только для пептидов и олигонуклеотидов. К настоящему времени область применения комбинаторных библиотек значительно расширилась и включила в себя белки, синтетические олигомеры, небольшие молекулы и олигосахариды. При этом, даже не обладая полными знаниями о структуре и функциях белков, не всегда понимая, какие изменения требуются в их первичной структуре для изменения их свойств, на основе комбинаторных библиотек возможно получение ферментов с заданными свойствами. Существуют разные типы библиотек, но сам процесс их использования сходен и состоит из 3 основных этапов: приготовления библиотеки, скрининга компонентов библиотеки и определения химической структуры активных компонентов. Огромное разнообразие антител позволяет обнаружить те клоны, которые способны взаимодействовать с высокой специфичностью практически с любым природным или синтетическим антигеном. В современной науке и медицине существует необходимость получения антител с определёнными свойствами, и одним из распространенных методов их получения является метод скрининга комбинаторных библиотек антител.

### 2.1 Комбинаторные фаговые библиотеки антител человека

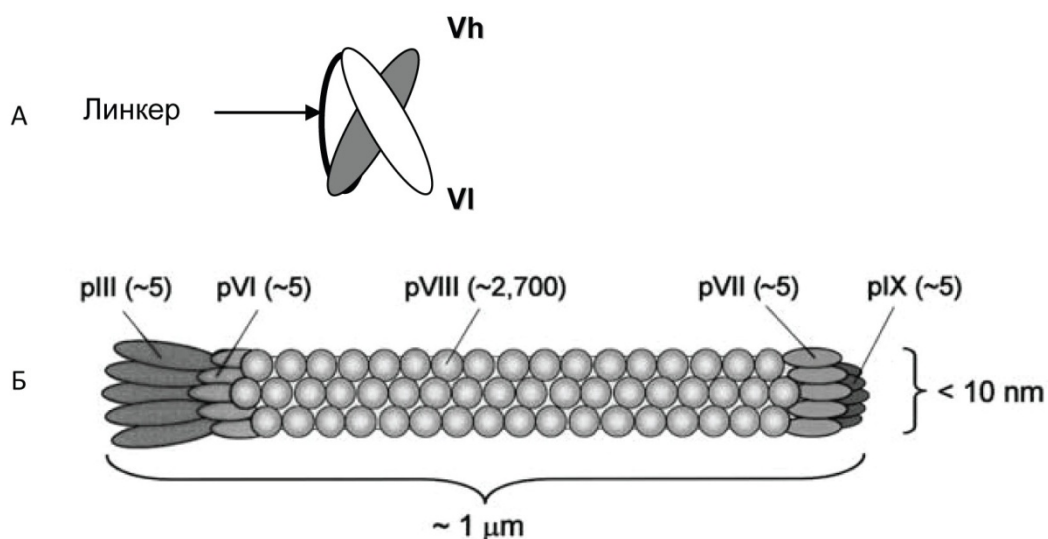
Природную стратегию созревания антител копирует комбинаторный подход к наработке антител *in vitro*, при котором проводят конструирование библиотек тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, соединенных случайным образом между собой. Из таких библиотек могут быть отобраны клоны, продуцирующие антитела, специфические к целевому антигену.

Комбинаторные фаговые библиотеки антител представляют собой своеобразный аналог популяций В-лимфоцитов, каждый из которых производит один тип антитела определенной специфичности [180]. Такие библиотеки получают на основе V-генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, при этом каждый клон *E.coli* продуцирует бактериофаги, экспонирующие на своей поверхности моноклональные АТ. Бактериофаги имеют ряд преимуществ – быстрый рост (уже через 30 мин после доставки ДНК в клетку хозяина начинается экспрессия собственных генов), небольшой размер и лёгкость в работе. Селекция фрагментов антител, представленных на поверхности фаговой частицы, происходит, как и селекция В-лимфоцитов, по способности взаимодействовать с антигеном. Подобно плазматическим клеткам, нарабатывающим АТ, бактериальные клетки, инфицированные фагами, в геноме которых содержатся соответствующие гены, способны секретировать растворимые фрагменты АТ. Как и в иммунной системе, в V-генах в результате случайного мутагенеза могут происходить нуклеотидные замены, приводящие к появлению антител с более высокой аффинностью.

На поверхности фаговой частицы экспонируют чаще всего одноцепочечные антитела или scFv (single chain Fragment variable), состоящие из переменного домена тяжелой цепи антитела, соединенной гибким линкером с переменным доменом легкой цепи (**рис.7**). Это самый маленький фрагмент антитела, сохраняющий его специфичность и содержащий только его антигенсвязывающий центр. В одноцепочечных антителах пептидный линкер является инструментом стабилизации переменных районов, заменяя нековалентные C<sub>H</sub>1-C<sub>L</sub> взаимодействия [181]. Требования к линкеру определены прежде всего структурой и химией Fv-района. Линкер должен быть гидрофильным и не иметь больших боковых радикалов, он должен обеспечивать соответствующую дистанцию между V-доменами (3.5 нм), не нарушая их нативную конформацию. Учитывая длину пептидной связи предпочтительно выбирать линкер не менее 10 аминокислот, для предупреждения конформационного напряжения, как правило, используют

15-мерный линкер. Наиболее часто используется последовательность линкера (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>.

Молекулы scFv склонны к образованию димеров и тримеров, которые могут затруднять селекцию и характеризацию специфичности. Но с другой стороны, из-за небольшого размера молекулы scFv-библиотеки более генетически стабильны, чем библиотеки также часто используемых для дисплея Fab фрагментов.



**Рисунок 7. Схематичное изображение молекулы scFv (А) и частицы фага М13 (Б).** Указаны размеры фаговой частицы, а также расположение и примерное количество копий белков фаговой оболочки.

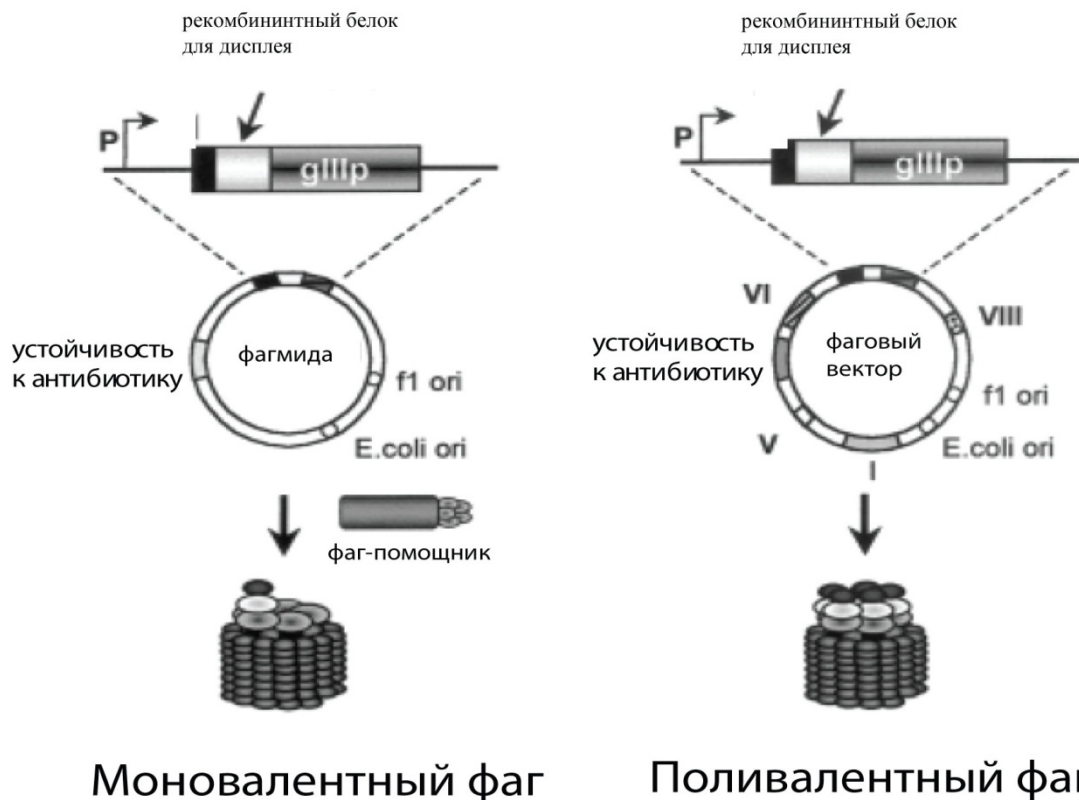
Для экспонирования Fab фрагмента на фаговой частице тяжелая цепь АТ обычно экспрессируется в составе слитного белка с белком рIII фаговой оболочки, а легкая цепь секретируется как растворимый белок в периплазматическое пространство клетки-хозяина. Далее в периплазме две цепи объединяются [182]. Использование Fab фрагментов позволяет проводить скрининг клонов, используя неочищенные клеточные лизаты. При этом для определения константы аффинности не требуется их дополнительной очистки, в отличие от растворимых молекул scFv из-за их способности к димеризации.

В зависимости от числа копий рекомбинантного белка, представленного на поверхности фаговой частицы, различают моновалентные и поливалентные библиотеки. В случае поливалентных библиотек ген, кодирующий рекомбинантный белок, помещается непосредственно в геном бактериофага

перед геном белка фаговой оболочки (обычно рIII). Таким образом, каждая копия рIII, экспонированная на фаговой частице, является слитной с копией рекомбинантного белка или пептида (рис.8). Но при определенном размере вставки (более 300 аминокислотных остатков) белок оболочки фага может терять свои функциональные свойства, при этом нарушаются процесс сборки фаговой частицы, или становится невозможным дальнейшее инфицирование клеток. В этом случае можно использовать гибридные фаговые системы, в которых ген химерного белка является дополнительным элементом в геноме фага, и таким образом, фаговые частицы экспонируют как белок дикого типа, так и химерный.

Альтернативной возможностью являются моновалентные библиотеки, где используется вспомогательный вектор фагида для переноса генетической информации в фаговую частицу. Фагиды сочетают в себе свойства плазмиды и фагового генома, содержат сайт инициации репликации и сигнал упаковки бактериофага, а также ориджин репликации и систему генной экспрессии плазмиды [183]. Фагиды существуют в бактериальной клетке в кольцевой двуцепочечной форме. Инфекция с помощью нитевидного фага-помощника, который содержит большинство фаговых генов, необходимых для формирования фаговых частиц, активирует репликацию фагида, ее упаковку в фаговую частицу и дальнейшую сборку фаговых частиц. В результате, при использовании подобной векторной системы, дикий тип рIII белка конкурирует с рекомбинантным рIII белком при включении в фаговую частицу. Получающаяся в результате фаговая популяция состоит из бактериофагов, экспонирующих от 0 до 5 копий антитела на фаговой частице. Фактически, большинство фаговых частиц экспонирует только одну копию антитела [184], что может быть использовано для отбора высоко аффинных молекул в ходе биопэннинга. Однако, если функциональность белка оболочки фага не нарушается из-за вставки рекомбинантного белка, то валентность фаговой частицы может быть увеличена с помощью использования модифицированного фага-помощника, например, M13λgIII, с отсутствующим геном выбранного оболочечного белка [180, 185, 186].





**Рисунок 8. Принципы моновалентного и поливалентного фагового дисплея (f1 ori: фаговый ориджин репликации; E. coli ori: бактериальный ориджин репликации; I, V, VI, VIII: гены, кодирующие фаговые белки; P: промотор, gIIIp – ген белка фаговой оболочки pIII)**

Конструирование комбинаторных фаговых библиотек антител начинается с выбора источника генного репертуара, в зависимости от которого можно выделить несколько видов библиотек антител: *наивные*, *иммунные* или *синтетические*. *Наивные* и *иммунные* библиотеки конструируют, используя естественным образом реорганизованные гены, кодирующие переменные домены иммуноглобулинов здоровых или иммунных к какому-либо антигену доноров, соответственно. Для этого выделяют мРНК клеток лимфоидного ряда, продуцирующих антитела. Чаще всего это лимфоциты периферической крови, но в некоторых случаях используют спленоциты [187, 188], клетки миндалин или лимфоциты костного мозга [189]. На основе мРНК синтезируют кДНК, при этом для праймирования реакции могут быть взяты олиго-dT праймеры и статистические гексаолигонуклеотиды, что позволяет получать кДНК копии всех возможных вариантов генов, кодирующих переменные домены антител [190].

Сразу могут использоваться один или несколько праймеров, ограничивающих набор амплифицируемых генов до одного или нескольких семейств генов переменных доменов или изоформ антител уже на уровне кДНК [191]. Праймеры, используемые для амплификации генов, кодирующих иммуноглобулины, комплементарны их наиболее консервативным участкам. Их последовательности выбирают из коллекций генов, которые организованы в базы данных, такие как база данных Kabat или V BASE. Дизайн праймеров также предусматривает наличие в них внутренних сайтов рестрикции, позволяющих клонировать ПЦР продукты в состав соответствующих векторов. Конструирование синтетических библиотек основано на замене природных CDR на набор случайных последовательностей, что позволяет создавать огромное разнообразие антигенсвязывающих сайтов.

## **2.2 Конструирование иммунных библиотек**

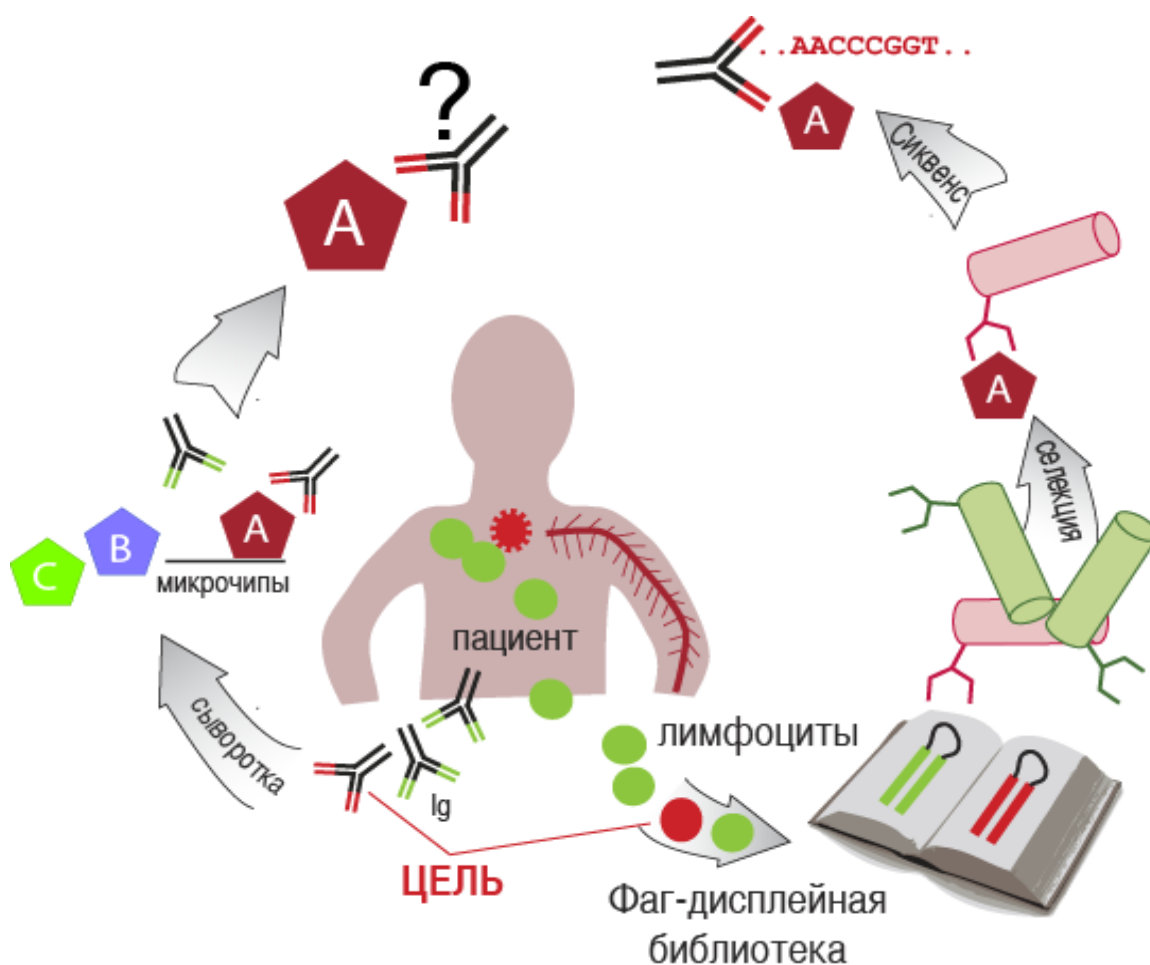
При работе с фаговыми библиотеками антител возникают технические неудобства. Например, для амплификации библиотеки размером  $10^{10}$  клонов требуется объем культуры в несколько десятков литров. Это во многом объясняет современную тенденцию предпочтения библиотек меньшего размера и узконаправленных репертуаров, полученных из иммунизированных доноров. *Иммунные библиотеки* обладают двумя основными характеристиками: они обогащены антиген специфичными антителами, и аффинность некоторых из этих антител уже имеет высокий уровень как следствие развития иммунного ответа. Таким образом, большую представленность в библиотеке имеют клоны, продуцирующие высокоаффинные антитела к антигену, использованному для иммунизации, появляющиеся в результате вторичного иммунного ответа на антиген. Поскольку представленность каждого семейства V-генов в популяции молекул определяет размер библиотеки и число клонов, необходимых для анализа, то в случае библиотек из иммунизированных животных достаточно

получить около  $10^6$  независимых рекомбинантов, чтобы среди них нашлись продуценты АТ, специфично связывающих использованный для иммунизации антиген. Тогда как библиотеки, сконструированные на основе генетического материала лимфоцитов неиммунных доноров, должны содержать, по крайней мере,  $10^8$  индивидуальных клонов, для воссоздания исходного разнообразия детерминант антител [192].

Схема конструирования иммунных библиотек для фрагментов антител человека такая же, как и для наивных библиотек. После выделения мРНК клеток лимфоидного ряда иммунизированных людей и синтеза на ее основе кДНК, проводят амплификацию репертуара V-генов. Затем тяжелые и легкие цепи случайным образом объединяют в составе соответствующего экспрессионного вектора, и полученным набором фагмид трансформируют клетки *E.coli*. Эти библиотеки обогащены комбинациями тяжелых и легких цепей, связывающих иммуноген, поскольку мРНК для специфических IgG производятся клонами активированных зрелых плазматических В-клеток в относительно больших количествах [193]. С помощью иммунных библиотек были получены различные фрагменты антител человека, связывающие широкий спектр антигенов, таких как ботулин [194], столбнячный токсин [195], ВИЧ [196, 197], респираторный синцитиальный вирус [198], вирус гепатита В и гепатита А [199], вирус простого герпеса [200], цитомегаловирус и вирус ветряной оспы [193, 201], вирус осповакцины (ВОВ) [202]. Помимо возможности отбора из иммунных библиотек фрагментов антител, связывающих бактериальные и вирусные антигены, иммунные библиотеки дают возможность отбирать аутоантитела, специфичные к различным собственным антигенам организма [203]. Иммунные комбинаторные библиотеки являются также источником биологически активных антител, на основе которых возможно создание терапевтических иммунных препаратов для профилактики и лечения инфекционных и других заболеваний человека.

При конструировании так называемых библиотек пациента сыворотка индивидуумов тестируется на присутствие специфических антител к определенному антигену. А затем из пула лимфоцитов индивидуумов,

показавших положительный сигнал, конструируются библиотеки, которые содержат фрагменты антител высокой специфичности [204]. Причиной высокой аффинности отбираемых антител является то, что комбинаторные библиотеки представляют так же и пары  $V_H$  и  $V_L$ , возникающие *in vivo*. Конструирование специализированных библиотек дает возможность получать антитела для изучения специфических биомолекул. Например, из библиотек, сконструированных на основе генетического материала лимфоцитов пациентов с определенными опухолями, можно отобрать антитела к специфическим опухолевым маркерам [204-206].



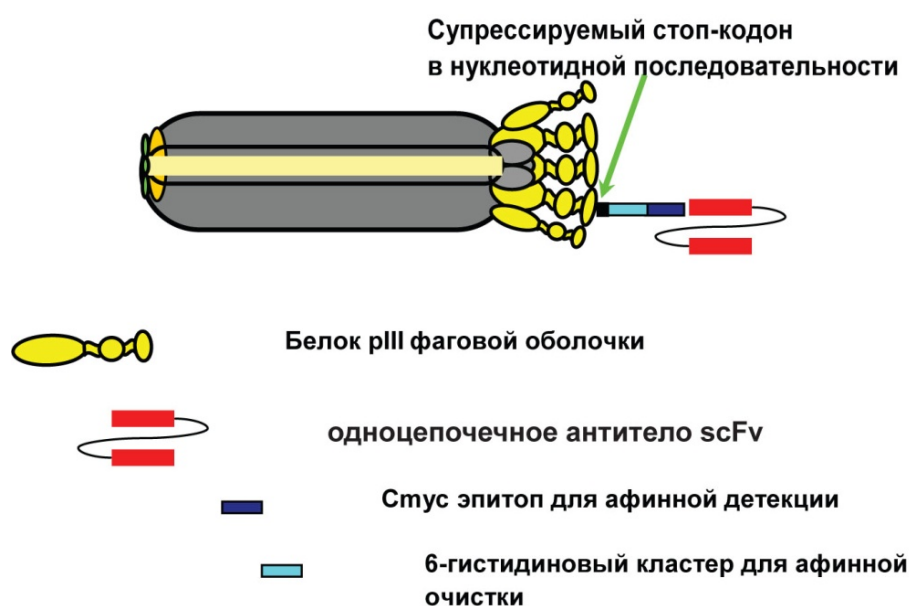
**Рисунок 9. Принципиальная схема подхода, используемого в работе.**

В настоящей работе мы использовали иммунную фаг-дисплейную библиотеку одноцепочечных антител, сконструированную на основе генетического материала лимфоцитов из крови больных рассеянным склерозом, для структурно-функционального анализа аутоантител к нейральным и вирусным антигенам.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 1. Проверка функциональности фаг-дисплейной библиотеки репертуара одноцепочечных антител больных рассеянным склерозом

Для исследования структурно-функциональных характеристик ОБМ-связывающих антител ранее в нашей лаборатории была сконструирована фаг-дисплейная библиотека одноцепочечных рекомбинантных антител. В качестве источника генетического материала использовали лимфоциты, выделенные из периферической крови 8 доноров – больных рассеянным склерозом (ремиттирующий-рецидивирующий тип течения). При конструировании за основу была взята схема создания так называемых «моновалентных» фаговых библиотек, где каждое одноцепочечное (scFv) антитело представлено в среднем 1 копией на поверхности отдельного нитчатого бактериофага M13 в составе белка оболочки pIII фаговой частицы (**рис.10**).



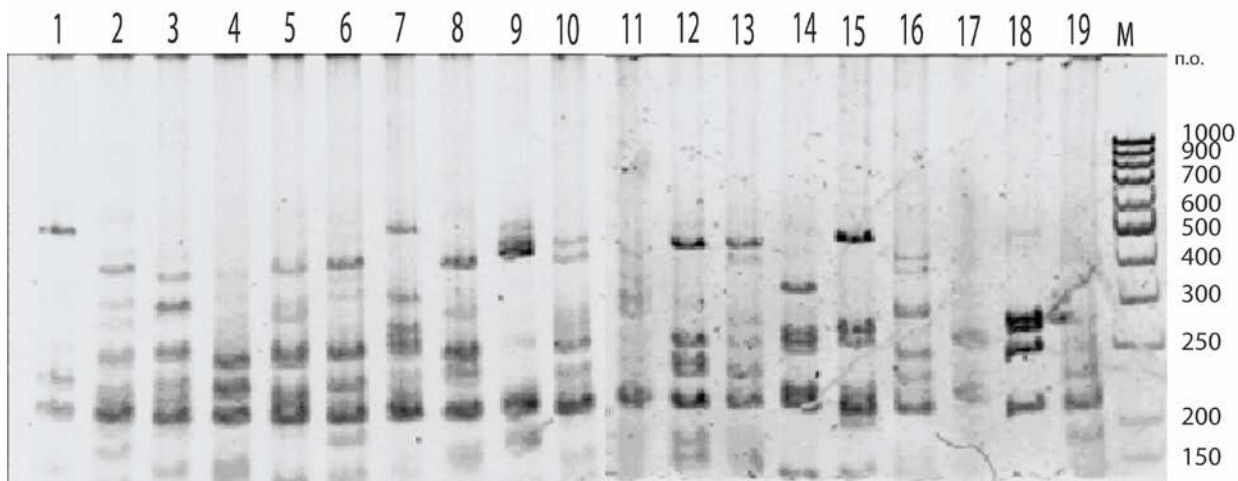
**Рисунок 10. Устройство фаговой библиотеки.**

При создании библиотеки для облегчения клонирования на первом этапе на основе фагмиды pHEN2 была сконструирована векторная фагмида pHEN-L. Фагмида pHEN-L содержит фрагмент ДНК, кодирующий гибкий серин-глициновый линкер, объединяющий V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-гены в единую ДНК-последовательность, а также сайты эндонуклеаз рестрикции для клонирования V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-фрагментов в соответствующей рамке. В фагмиду pHEN-L

последовательно встраивали ПЦР фрагменты, кодирующие репертуары  $V_H$ - и  $V_L$ -генов антител. Полученное одноцепочечное антитело было объединено с геном белка рIII через последовательность варибельного участка тяжелой цепи ( $V_H$ ). Нуклеотидная последовательность, кодирующая *lac*-промотор, *RelB*-лидер и 6-гистидиновый кластер осталась неизменной. Амплифицированный репертуар генов  $V_H$  был клонирован в модифицированный рHENT вектор, тем самым была получена библиотека варибельных тяжелых цепей IgG размером  $1.8 \cdot 10^7$  независимых клонов. Полученная библиотека далее использовалась для клонирования  $V_L$  репертуара. Эффективность клонирования проверялась после каждого шага ПЦР анализом 50 случайных клонов. В результате была получена библиотека одноцепочечных антител человека представительностью приблизительно  $8 \cdot 10^9$  независимых клонов.

Для дальнейшей работы с библиотекой необходимо было оценить её функциональный размер (то есть процент клонов, содержащих правильно собранные scFv-гены, способные продуцировать индивидуальные молекулы одноцепочечных антител). Для первичной проверки функциональности и разнообразия методом ПЦР амплифицировали scFv-гены с фагмидной ДНК из 50 случайно выбранных клонов. Было показано, что фагмидные ДНК, выделенные из 44 клонов (88% от исследованного количества), содержали ДНК последовательности, по размеру совпадающие с scFv-генами. Из них выбрали 19 клонов для оценки разнообразия последовательностей антител библиотеки с помощью ПДРФ-анализа scFv-генов. Для каждого клона наблюдали уникальную картину рестрикции (**рис.11**). Это позволило нам сделать предположение, что последовательности scFv-генов с большой вероятностью уникальны и не повторяются в данной библиотеке.

Для более точного и однозначного подтверждения функциональности библиотеки использовали метод широкомасштабного секвенирования с использованием технологии Illumina. Полученная библиотека РС была амплифицирована в клетках *E.coli* штамма TG1. Далее тяжелые ( $V_H$ ) и легкие ( $V_L$ ) цепи были амплифицированы методом ПЦР со специфических



**Рисунок 11. ПДРФ-анализ библиотеки РС.** Электрофоретический анализ продуктов рестрикции ПЦР-продуктов, содержащих нуклеотидные последовательности ДНК, кодирующей одноцепочечные антитела, для 19 случайно выбранных клонов. ПЦР-продукты были гидролизованы мелкощепящей эндонуклеазой рестрикции *Hae*III (*Bsu*RI), продукты рестрикции были разделены в 6% ПААГ.

праймеров. 100 тысяч полученных последовательностей были секвенированы с использованием технологии MiSeq. После обработки и объединения соответствующих прочтений  $V_H$  и  $V_L$  было показано, что около 70% последовательностей содержали одноцепочечные антитела в функциональной рамке считывания. Таким образом, разнообразие библиотеки составило 70% от первоначально определенного ( $\sim 5 \cdot 10^9$ ).

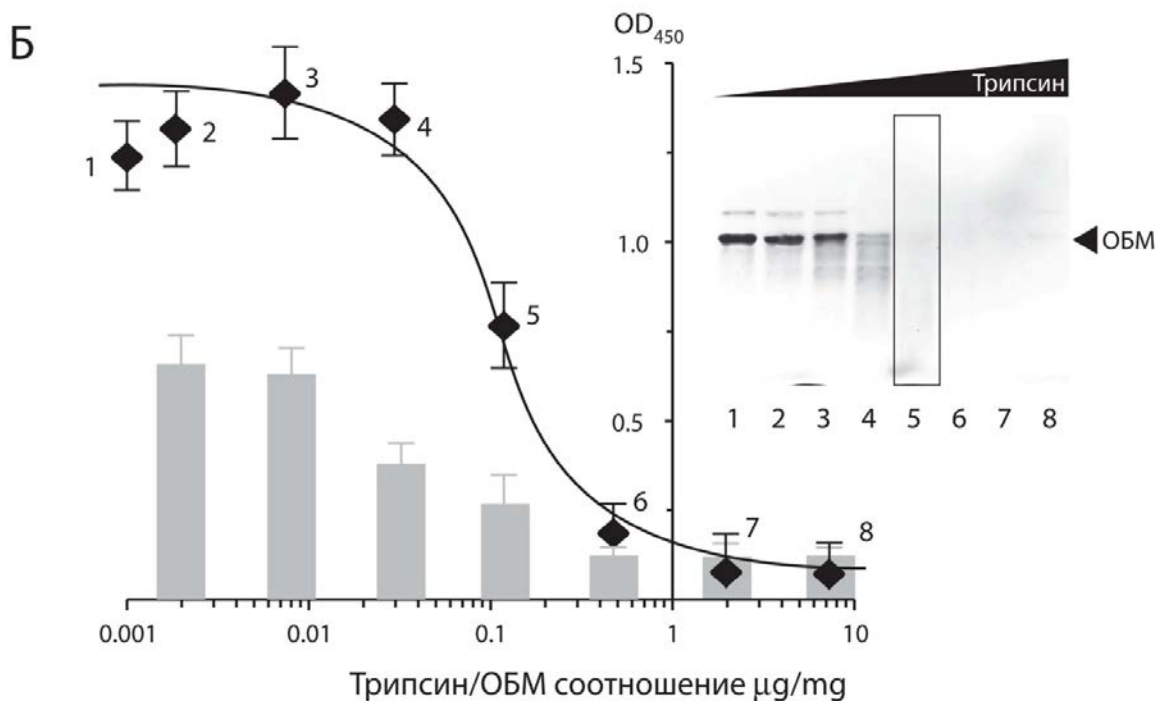
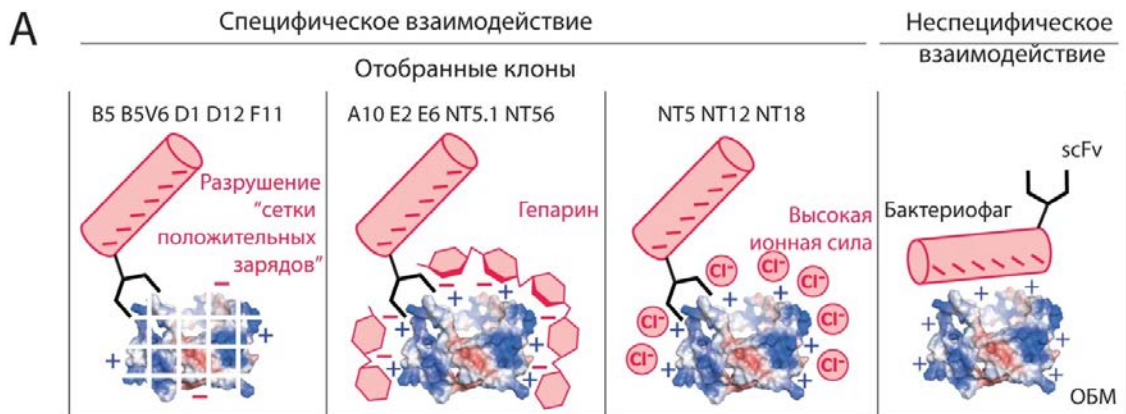
## **2. Скрининг библиотеки на ОБМ и получение моноклональных одноцепочечных антител, связывающих ОБМ.**

В качестве потенциального антигена для поиска патогенных антител нами был выбран ОБМ. В литературе в течение двух последних десятилетий дебатруется вопрос о значении анти-ОБМ антител в развитии РС [42, 45, 53]. По нашему мнению данный аспект требует прояснения на структурно-молекулярном уровне, в этой связи мы решили отобрать ОБМ-специфичные антитела из библиотеки больных РС, и в дальнейшем исследовать их специфичность и структурные особенности. Одной из основных трудностей при работе с ОБМ является его чрезвычайно высокий поверхностный положительный заряд. Из литературных данных известно, что при проведении

ИФА с этим белком наблюдались высокие фоновые значения и ложноположительные сигналы, мешающие правильной интерпретации результатов [207, 208]. Кроме того, высокий положительный заряд антигена может увеличивать неспецифическое связывание с отрицательно заряженным белком р8 – преобладающим белком оболочки бактериофага М13К07. Для решения этой проблемы можно использовать растворы с высокой ионной силой или применять специальные заряд-нейтрализующие агенты. Ранее было предложено, например, использование пептида (Lys)<sub>18</sub> для «оборачивания» бактериофага или мутированный бактериофаг М13К07 с дополнительным лизином, интегрированным в каждую копию белка р8. Благодаря этим модификациям автором удалось заметно уменьшить неспецифическое связывание [209]. В настоящей работе для уменьшения неспецифического связывания при скрининге фаг-дисплейной библиотеки на ОБМ мы решили использовать следующие способы (**рис.12 А**): (i) ограниченный трипсинолиз ОБМ для понижения плотности положительного поверхностного заряда молекулы, (ii) отбор на полноразмерную молекулу ОБМ с нейтрализацией положительного заряда белка добавлением гепарина, (iii) и отбором в присутствии буфера с высокой ионной силой (0.5 М NaCl).

Для осуществления первого подхода был проведен ограниченный трипсинолиз ОБМ. Лимитированное расщепление молекулы ОБМ после остатков лизина и аргинина понижает плотность сетки положительных зарядов молекулы и, соответственно, уменьшает уровень неспецифической сорбции. Экспериментально был подобран необходимый уровень гидролиза, при котором связывание мышинных поликлональных анти-ОБМ антител (положительный контроль) с гидролизатом ОБМ было сопоставимо со связыванием с полноразмерной молекулой ОБМ, а неспецифическое связывание с бактериофагом М13К07 – минимально. Для этого мы варьировали концентрацию трипсина от 10 мкг до 0.001 мкг на мг ОБМ (время гидролиза составляло 1 час при 37°C).





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

На **рисунке 12 Б** представлены результаты ИФА связывания поликлональных антител и бактериофагов M13K07 с гидролизатами ОБМ и электрофоретическое разделение этих гидролизатов. По соотношению специфического связывания к уровню фона была выбрана точка «5», соответствующая обработке ОБМ трипсином в концентрации 0.12 мкг на мг ОБМ в течение 1 часа. Далее каждая схема обогащения была использована для проведения 5 раундов селекции, что позволило в итоге отобрать 13 клонов одноцепочечных антител, связывающих ОБМ.

## 2. Анализ полученных одноцепочечных антител, связывающих ОБМ

### 3.1 Анализ одноцепочечных анти-ОБМ антител, экспонированных на бактериофаге.

Для первичной характеристики отобранных антител и подтверждения их специфичности был проведен дополнительный ИФА связывания с ОБМ одноцепочечных антител в составе индивидуальных фаговых клонов. Для этого использовали 3 способа:

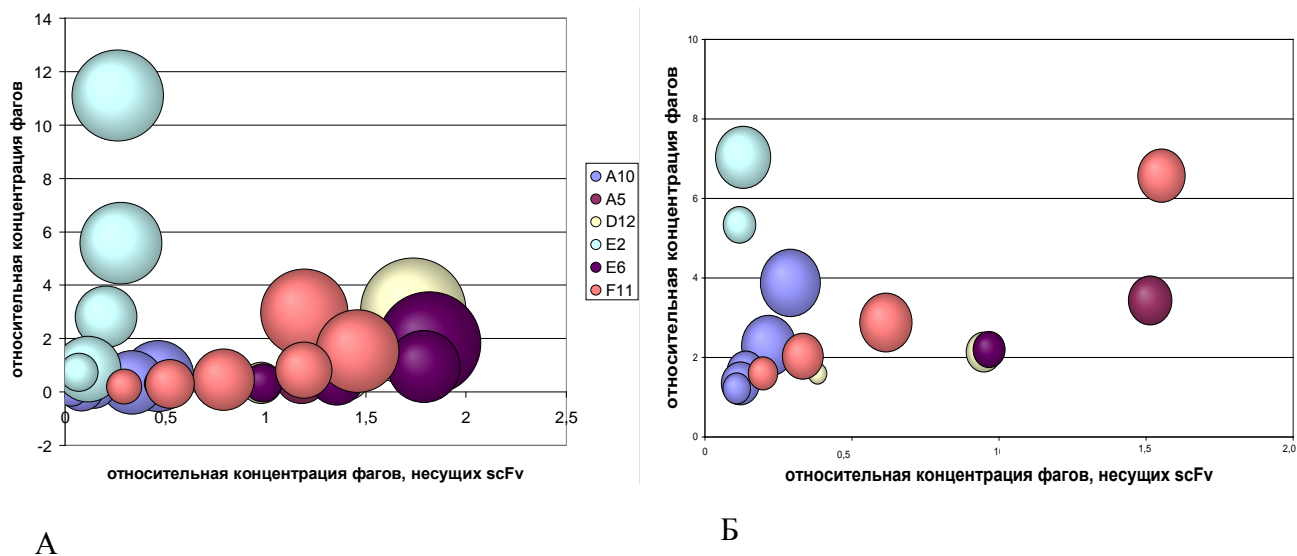
- Определение титра фаговых частиц на чашках с антибиотиком. Метод позволяет определить количество фаговых клонов, содержащих фагмиду с устойчивостью к антибиотику, но не учитывает, какая часть из них несёт на своей поверхности одноцепочечные антитела.

- Определение общего количества фаговых частиц методом ИФА. Фаговые частицы адсорбировали в лунках с предварительно иммобилизованными антителами к белку фаговой оболочки. Детекцию проводили с помощью антител к белку фаговой оболочки, конъюгированных с пероксидазой (так же не позволяет учесть количество фагов, несущих на своей поверхности антитела).

- Определения количества фаговых частиц, несущих на своей поверхности антитела, методом ИФА. Фаговые частицы адсорбировали в лунках с предварительно иммобилизованными антителами к с-тус-эпитопу. С-тус эпитоп был расположен между последовательностью одноцепочечного антитела и белка фаговой оболочки на поверхности фаговой частицы. Детекцию проводили с помощью антител к белку фаговой оболочки, конъюгированных с пероксидазой.

Определение концентрации фаговых частиц всеми тремя методами позволило корректно провести дальнейший сравнительный анализ их уровня связывания с ОБМ. То есть, например, третьим способом мы узнаем только количество фагов с scFv, в то время, как в растворе большая часть фагов может не нести их; в то же время при высоких концентрациях фагов сигнал связывания с ОБМ, обусловленный неспецифическим взаимодействием,

может быть высоким, что является ложноположительным результатом и дает нам неправильные представления о свойствах презентированных антител. Поэтому использование всех трех методов нормирования концентрации фагов и антител на фаговых частицах является в данном случае необходимым. После выравнивания концентраций проводили ИФА на предмет связывания индивидуальных фаговых клонов с молекулой ОБМ. На **рисунке 13** по оси ординат отложена относительная концентрация бактериофагов, а по оси абсцисс относительная концентрация фагов, несущих на своей поверхности scFv. Площадь круга пропорциональна сигналу связывания ОБМ согласно результатам ИФА. Каждый фаговый клон наносили в нескольких разведениях. Таким образом, чем меньше угол наклона прямой, соединяющей индивидуальные точки, тем большая часть бактериофагов несет на своей поверхности scFv, и чем ниже находятся круги с большей площадью, тем сильнее относительное связывание ОБМ. Из данных рисунков видно, что наибольшим связыванием обладают клоны F11, E2 и A10.



**Рисунок 13. Связывание бактериофагов, экспрессирующих на своей поверхности scFv, с ОБМ в зависимости от их.** А) показаны все анализируемые концентрации фаговых частиц Б) увеличение рис.11А в районе низких концентраций фаговых частиц. Объяснения см. в тексте.

### 3.2 Анализ одноцепочечных антител в индивидуальном виде.

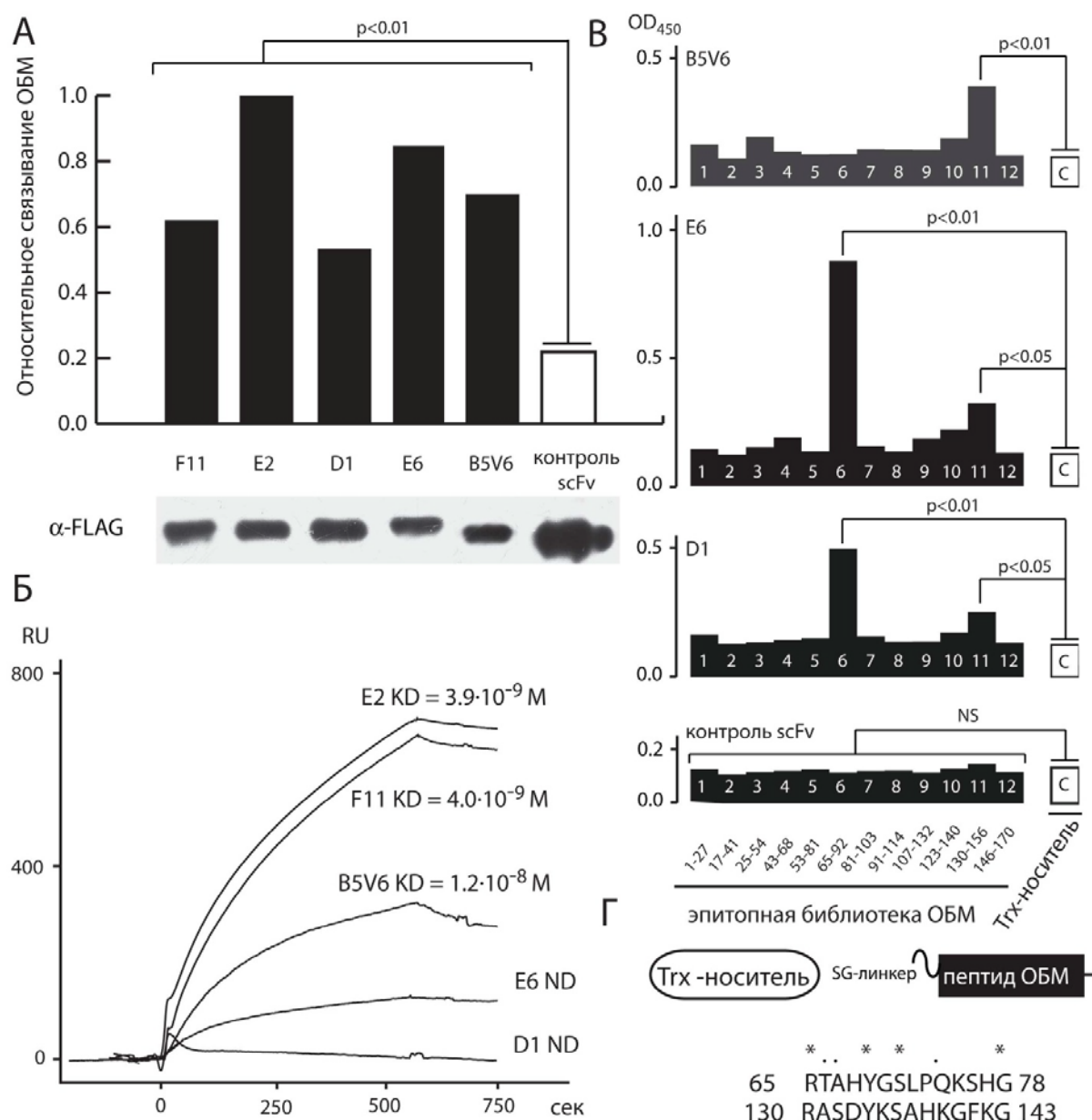
Далее необходимо было подтвердить специфичность отобранных scFv к ОБМ в индивидуальном виде отдельно от фаговых частиц. Наличие в

генетической конструкции, кодирующей гены scFv, супрессируемого стоп-кодона позволяло проводить экспрессию свободных, не связанных с белком фаговой оболочки scFv, в несупрессирующем штамме *E.coli HB2151*. В процессе работы нами были дополнительно оптимизированы условия экспрессии путем варьирования температуры и концентрации индуктора экспрессии IPTG. К сожалению, уровень экспрессии исследуемых scFv был чрезвычайно низким. Поэтому нуклеотидные последовательности отобранных scFv были переставлены в вектор, сконструированный на основе pET22b с сильным T7 промотором. Дополнительно 3xFLAG-эпитоп был интегрирован на С-конец белка для более чувствительной детекции и очистки. В результате проведенной работы нам удалось получить scFv в растворимом виде для 5 отобранных моноклонов (E2, F11, B5V6, E6 и D1), доведя уровень продукции до 1.0 мг/л.

Силу связывания scFv с ОБМ оценивали методом ИФА. Все одноцепочечные антитела показали достоверное связывание и специфичность по сравнению с отрицательным контролем (одноцепочечным антителом к тиреоглобулину, проэкспрессированным и очищенным в тех же условиях) (**Рис.14 А**). Так же мы охарактеризовали количественно силу связывания отобранных антител с ОБМ методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (**рис.14 Б**). Клоны E2 и F11 связывали ОБМ с  $K_D$  близкими к наномолярным значениям ( $3.9 \cdot 10^9$  и  $4.0 \cdot 10^9$  М, соответственно), а B5V6 с  $K_D \sim 1.2 \cdot 10^8$  М. При этом для одноцепочечных антител D1 и E6  $K_D$  оценить не удалось вследствие недостаточной силы связывания.

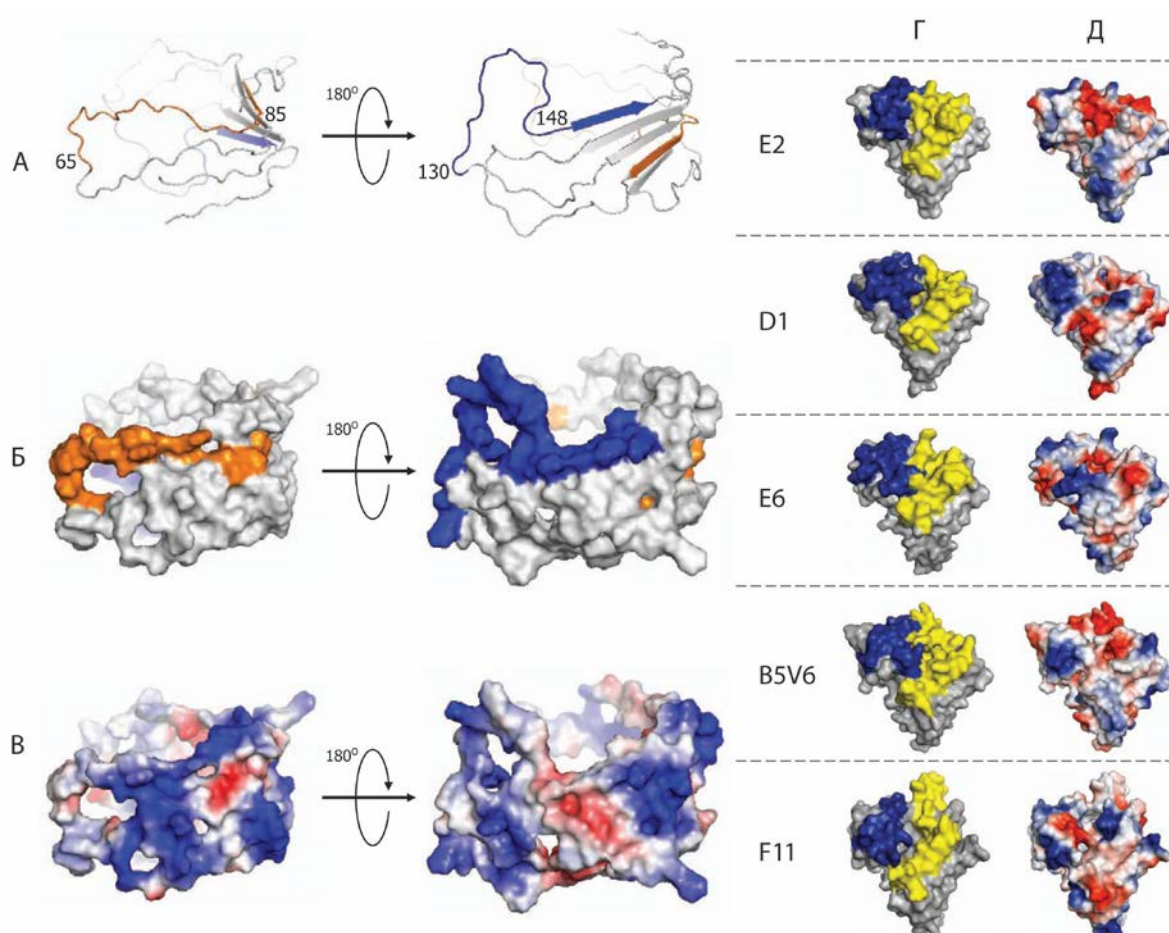
Следующей задачей было определение сайтов связывания ОБМ отобранными антителами. Для этого использовалась ранее созданная в нашей лаборатории эпитопная библиотека ОБМ [210], в которой молекула ОБМ была разделена на 12 перекрывающихся фрагментов длиной около 25 аминокислотных остатков. Пептиды ОБМ были интегрированы в состав слитного белка, состоящего из тиоредоксина, двух 6-гистидиновых кластеров для аффинной очистки белка и стус-эпитопа для детекции моноклональными антителами (см. **рис.14 В**). В качестве отрицательного контроля была создана

генетическая конструкция, не содержащая в своем составе фрагментов ОБМ, а состоящая только из элементов белка-носителя (Тгх-носитель – тиоредоксин+линкер). Нам не удалось обнаружить какой-либо определенный эпитоп для антител E2 и F11, в то время как D1 и E6 специфично взаимодействовали с фрагментами ОБМ 65–92 и 130–156 (см. **рис.14 В**). Анализ последовательности ОБМ выявил возможные супермотивы внутри этих эпитопов (**рис.14 Г**). На основе полученных данных можно предположить, что антитела D1 и E6 узнают линейные эпитопы ОБМ, а E2 и



**Рисунок 14. А.** Связывание отобранных scFv с ОБМ, ИФА. **Б.** Связывание отобранных scFv с ОБМ, метод поверхностного плазмонного резонанса. **В.** Связывание отобранных scFv с фрагментами библиотеки ОБМ, ИФА. **Г.** Схема эпитопной библиотеки ОБМ. Супермотив, присутствующий в пептидах 6 и 11.

F11 скорее всего конформационные. Антитело B5V6 занимает промежуточное положение, взаимодействуя и с полноразмерной молекулой ОБМ и с фрагментом 130–156. Анализ пространственной модели ОБМ выявил, что найденные мотивы находятся на двух подвижных петлях 65-85 и 130-148. Таким образом предсказанный эпитоп для B5V6 так же находится в этой внешней петле (**рис.15 А, Б**). Отрицательно заряженный и в большой степени гидрофобный желобок scFv B5V6 может взаимодействовать с петлей ОБМ 136-145, выступающей на поверхности и несущей частично положительный заряд.



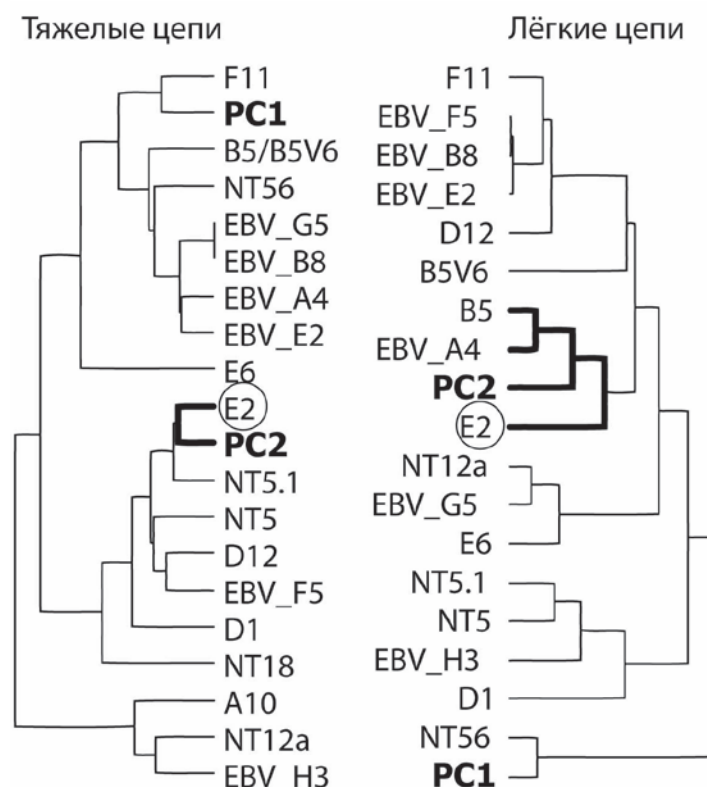
**Рисунок 15. (А-В) 3D-модели молекулы ОБМ (PDBbank).** Последовательности фрагментов 65-92 (6) и 130-156 (11) помечены соответственно коричневым и синим цветом на картинках (А и Б). Области, заряженные отрицательно, окрашены красным, положительно - синим, нейтрально заряженная поверхность представлена серым цветом (В). **3D-модели молекул scFv (Г-Д).** Участки CDR лёгких цепей окрашены синим, CDR тяжелых цепей окрашены желтым (Г). Области, заряженные отрицательно, окрашены красным, положительно - синим, нейтрально заряженная поверхность представлена серым цветом (Д). Моделирование осуществлено с помощью программы PyMol software.

Интересно заметить, что наши данные совпадают с результатами, описывающими распределение связывания поликлональных антител из сыворотки больных РС с ОБМ [210], где фрагменты 65-92 и 130-156 были определены как иммуннодоминантные.

### ***3.3 Определение гомологии зародышевых линий.***

Использование фаг-дисплейной библиотеки генов иммуноглобулинов позволило не только идентифицировать индивидуальные клоны, но и охарактеризовать их структуру (**Таблица 1**). Последовательности 11 полных scFv и 2 отдельных тяжелых цепей были проанализированы с помощью программы Ig BLAST для определения ближайших зародышевых семейств для  $V_H$  и  $V_L$  регионов (**Таблица 2**). Для тяжелых цепей преобладали семейства HV1 и HV3 (соответственно 4 и 6 клонов из 13). Так же мы сравнили полученные антитела с охарактеризованными ранее из базы данных с использованием программы Protein BLAST. В результате нами была обнаружена высокая гомология аминокислотной последовательности (до 95%) между отобранными scFv и переменными регионами анти-LMP1 антител, отобранными ранее из библиотеки Griffin1 [211], и патогенных аутоантител из ЦСЖ больных РС [54] (**Рис.16**). 10 тяжелых и 7 лёгких цепей из 13 отобранных scFv были схожи с анти-LMP1 антителами (**Таблица 1,2, Рис.16**). Обе цепи scFv D12 принадлежали тому же зародышевому семейству, что и анти-LMP1 антитело F5. ScFv NT5.1, NT12 и B5 состояли из комбинаций тяжелых и лёгких цепей, гомологичных к различным анти-LMP1 антителам. Любопытно, что scFv NT56 содержало тяжелую цепь, гомологичную таковой для анти-LMP1 антитела, и лёгкую цепь, гомологичную легкой цепи природного антитела при РС. ScFv F11 наоборот содержало цепи, гомологичные лёгкой цепи анти-LMP1 антитела и тяжелой цепи антитела при РС. Наконец, scFv E2 было гомологично антителу при РС по обеим цепям, при этом лёгкая цепь относилась к тому же зародышевому семейству, что и анти-LMP1 антитело A4.

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



**Рисунок 16. Гомология отобранных scFv с ранее опубликованными антителами;** жирным шрифтом отмечены антитела из ЦСЖ больных РС [54]; курсивом отмечены антитела, связывающие LMP1 вируса Эпштейн-Барр (EBV) [211].



**Таблица 1. Последовательности переменных фрагментов отобранных антител, специфичных к ОБМ (обычный шрифт), а так же ранее опубликованные последовательности антител из ЦСЖ больших РС (жирный шрифт), антител отобранных на связывание LMP1 из фаг-дисплейной библиотеки Гриффина 1 (курсив) и irrelevantные антитела (подчернуты).**

<b>Лёгкие цепи</b>	
D12	LPVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--GNDQRFSGVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--GTWDDSLNGVHVFGGTTQLTFLV
F11	LPVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--TNNRQRFSGVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDRLNG--VVFVGGTCKLTVL
EBV_F5	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
EBV_B8	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
EBV_E2	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
B5	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
EBV_A4	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
<b>MS2</b>	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
E2	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
NT12a	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
E6	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
EBV_G5	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
B5V6	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
NT5_1	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
NT5	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
EBV_H3	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
D1	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
NT56	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
<b>MS1</b>	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
A17	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
<u>GenA</u>	QSVLTQPPASAG--TPGQRVTTSCSGSSNNI--GNTDVTWYQQLPCTAPKLLIY--RNNQRFSVDPDRFVSG--KSGTASLAIISGLQSEGEADYYC--AAWDDSLSL--VFGGTTCKLTVL
<b>Тяжёлые цепи</b>	
F11	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--IFWSEPLVGGIYVYVNGLDVWGQGTFTVTVSS
<b>MS1</b>	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--NSGYSIS--RDVY-----WGQGTFTVTVSS
B5	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
NT56	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
EBV_G5	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
EBV_E2	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
EBV_A4	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
E6	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
E2	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
<b>MS2</b>	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
NT5_1	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
NT5	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
D12	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
EBV_F5	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
D1	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
NT18	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
NT12a	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
EBV_H3	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
A10	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
A17	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS
<u>GenA</u>	EVQLVDSGAEVKKPQGSVKVSKCAKSGYFTF--NRAINWVRQAPGQGLEWMMGIIPIYGTITNVAQKRFQDRVTITADKFTTAAIMELNSLRSEDTAVYYCAR--EVSQYSD--Y--GDVYY--MDVWVGKGTMTVTVSS

Варибельные фрагменты framework отмечены жирным шрифтом, CDR – обычным шрифтом.

**Таблица 2. Гомология тяжелых и лёгких цепей отобранных одноцепочечных антител с антителами (по литературным данным) из ЦСЖ больных РС и антителами отобранными на связывание LMP1 из фаг-дисплейной библиотеки Гриффина 1. Антитела специфичные к LMP1, отобранные ранее из фаг-дисплейной библиотеки Гриффина 1 помечены курсивом [211]. Антитела из ЦСЖ больных РС отмечены жирным шрифтом [54].**

отобранные scFv	зародышевая линия тяжелой цепи	гомологичные антитела	зародышевая линия тяжелой цепи	родственные зародышевые линии
E2	HV3-11*	MS2	HV3-11*	HV3-48*
NT12	HV4-61*	<i>EBV_H3</i>	HV7-b*-01	HV7 -61*/-39*/-59*/-28*
A10	HV4-59*			
E6	HV5-51			
B5	HV1-8*	<i>EBV_G5</i>	HV1-2*-04	HV1 -46*/-8*/-3*/-18*
NT56	HV1-18*			
B5V6	HV1-8*			
NT5	HV3-23*	<i>EBV_F5</i>	HV3-23*	HV3 -43*/-64*/-53*/-48*
D1	HV3-23*			
D12	HV3-23*			
NT18	HV3-53*			
NT5.1	HV3-48*			
F11	HV1-69*	MS1	HV1-69*	

отобранные scFv	зародышевая линия лёгкой цепи	гомологичные антитела	зародышевая линия лёгкой цепи	родственные зародышевые линии
NT12	LV3-19*	<i>EBV_G5</i>	LV3-19*-01	
E6	LV3-19*			
B5V6	LV6-57*			
B5	LV2-14*	<i>EBV_A4</i>	LV2-14*-01	LV2 -23*/-8*/-11*
E2	LV2-14*	MS2	LV2-11*	
NT5	KV-1-6*			
F11	LV1-44*	<i>EBV_F5, B8, E2</i>	LV1-47*-01	LV1-44*
D12	LV1-44*			
D1	KV3-20*			
NT5.1	KV1-12*	<i>EBV_H3</i>	KV1-39*-01	KV1 -12*/-8*/-16*
NT56	LV4-69*	MS1	LV4-69*	
NT18	нет			
A10	нет			

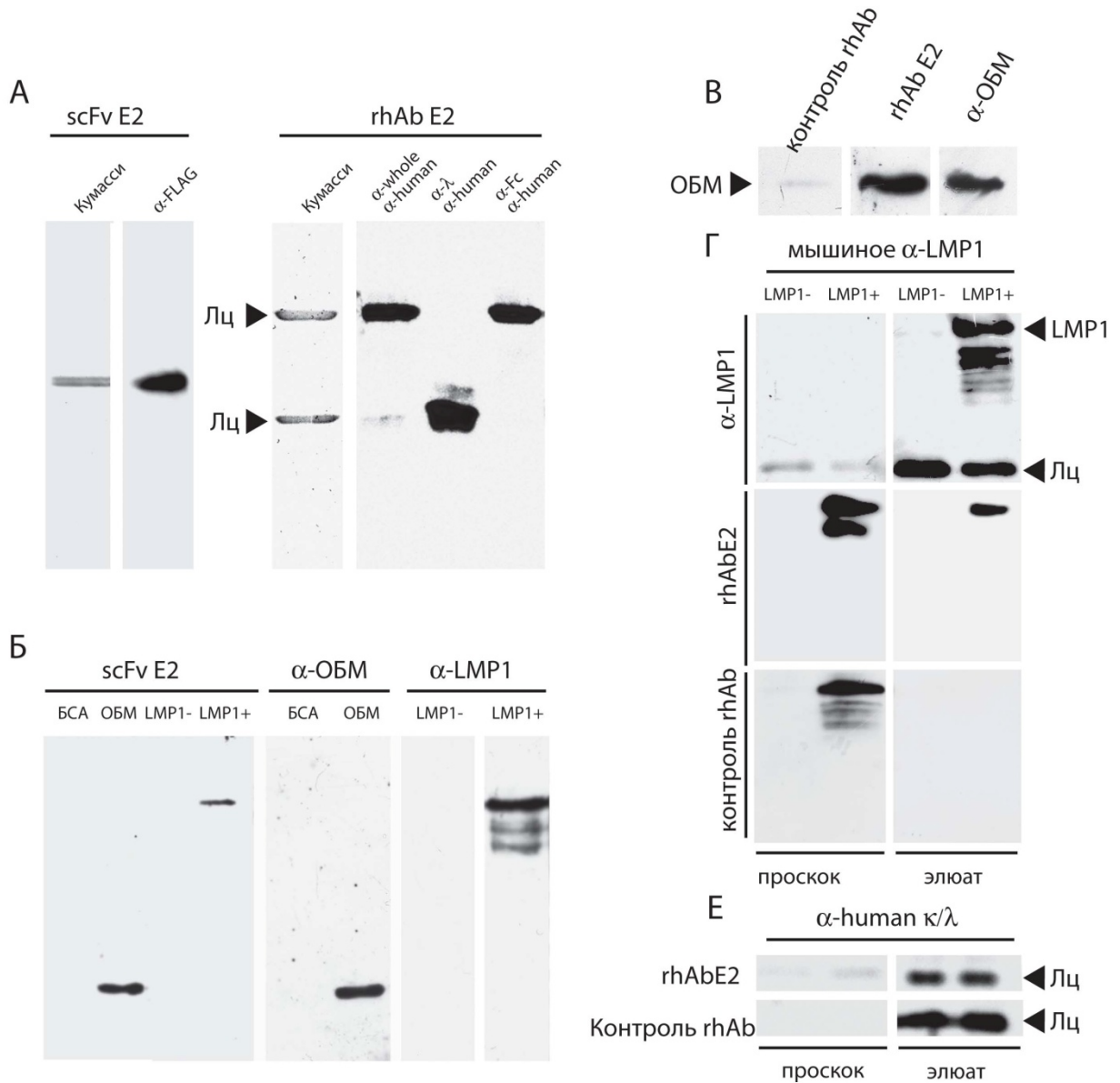
### **3. Получение полноразмерных человеческих антител на основе одноцепочечных антител, связывающих ОБМ**

Для дальнейшего доказательства патогенной роли отобранных одноцепочечных анти-ОБМ антител в организме человека, необходимо было показать их функциональность в виде полноразмерного IgG человека. Для этого фрагменты ДНК, кодирующие переменные фрагменты клонов с наибольшей аффинностью к ОБМ (B5, B5V6, E2, F11) были интегрированы в плазмидные вектора для эукариотической экспрессии полноразмерных антител в линии клеток CHO K-1. Далее полученными генетическими конструкциями проводили котрансфекция клеток линии CHO K-1. После двухнедельной селекции на антибиотике для каждого антитела проводили расклонирование, по итогам которого выбирали моноклоны с наибольшим уровнем продукции. В дальнейшем моноклоны-продуценты переводили на 225см<sup>2</sup> флаконы и осуществляли наработку полноразмерных антител в бессывороточной среде (для каждого моноклона подбирали свою бессывороточную среду). Уровень экспрессии достигал 5-7 мг/л. Далее антитела очищали методом аффинной хроматографии на смоле protein-G, дополнительную очистку проводили методом гель-фильтрации на колонке Superdex-75.

#### **4.1 Доказательство *in vitro* кроссреактивности между аутоантигеном ОБМ и белком вируса Эпштейна-Барр LMP1**

Структурная гомология отобранных одноцепочечных антител одновременно с антителами из ЦСЖ больных РС, и с антителами, специфичными к LMP1, привела нас к мысли проверить, возможна ли подобная кроссреактивность *in vitro*. Для этого методом Вестерн-блоттинга мы проанализировали связывание одноцепочечных антител с белками ОБМ и LMP1 (Рис.17 Б, левая часть). В качестве препарата LMP1 мы использовали эукариотические клетки НЕК293, экспрессирующие рекомбинантный LMP1, нетрансфицированную линию клеток использовали в качестве отрицательного контроля. Нам удалось показать, что scFv E2 взаимодействует и с LMP1, и с

ОБМ. Для доказательства того, что детектируемое связывание scFv с ОБМ не является результатом неправильного фолдинга, необходимо было воспроизвести эксперимент на полноразмерных IgG. В случае полноразмерного антитела E2 методом вестерн-блоттинга нам так же удалось показать одновременное связывание ОБМ (рис.17 В) и осаждение LMP1 этим антителом из раствора (рис.17 Г).



**Рисунок 17. А.** Анализ очищенного растворимого препарата scFv E2 (левая часть) и полноразмерного hAb, несущего его варибельный фрагмент (правая часть). **Б.** Вестерн-блот анализ связывания ScFv E2 с ОБМ и LMP1. Рекombинантное человеческое антитело E2 специфично связывает ОБМ (В) и иммунноприцепитирует LMP1 из раствора(Г).

Таким образом, нами впервые было показано кроссреактивное связывание вирусного и эндогенного антигенов моноклональным аутоантителом из

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

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

Несмотря на то, что мы проверили и доказали функциональность отобранных scFv в виде полноразмерных антител, существует достаточно большая вероятность того, что в организме больного конкретно таких комбинаций тяжелой и лёгкой цепи может не встречаться. Это связано со способом получения комбинаторных библиотек, когда  $V_H$  и  $V_L$  репертуары пациентов с РС случайным образом объединяется, создавая при этом вероятно новые комбинации антител, не существующие в организме больного. В связи с этим нами была поставлена задача проверить, как изменятся характеристики рациональных комбинаций отобранных  $V_H$  и  $V_L$ . Для комбинаторного анализа мы выбрали антитела A10, B5, B5V6, E2, F11, из которых у антител B5 и B5V6 одинаковые тяжелые цепи, а у антитела A10 присутствует только тяжелая цепь, всего 16 вариантов. Дополнительно мы добавили несколько контрольных комбинаций с цепями антител другой специфичности (A17 и ТГ антитела из библиотеки Griffin 1 специфичные к фосфонату и тиреоглобулину, соответственно) (**Таблица3**).

**Таблица 3. Название тяжелых и легких цепей, использованных для комбинаторного анализа.**

scFv	A10	B5	B5V6	E2	F11	A17	ТГ
Тяжелая цепь	A10	B5	B5	E2	F11	A17	ТГ
Лёгкая цепь	-	B5	B5V6	E2	F11	A17	ТГ
специфичность	ОБМ	ОБМ	ОБМ	ОБМ	ОБМ	фосфонат	тиреоглобулин

Описанные комбинированные антитела были получены путем котрансфекции плазмид, кодирующие соответствующие тяжелые и легкие цепи, в эукариотические клетки линии CHO K-1. Нарботку и очистку антител проводили аналогично предыдущему описанию. Характеризация цепей по зарядам и длинам гипервариабельных участков представлена в *таблице 4*.

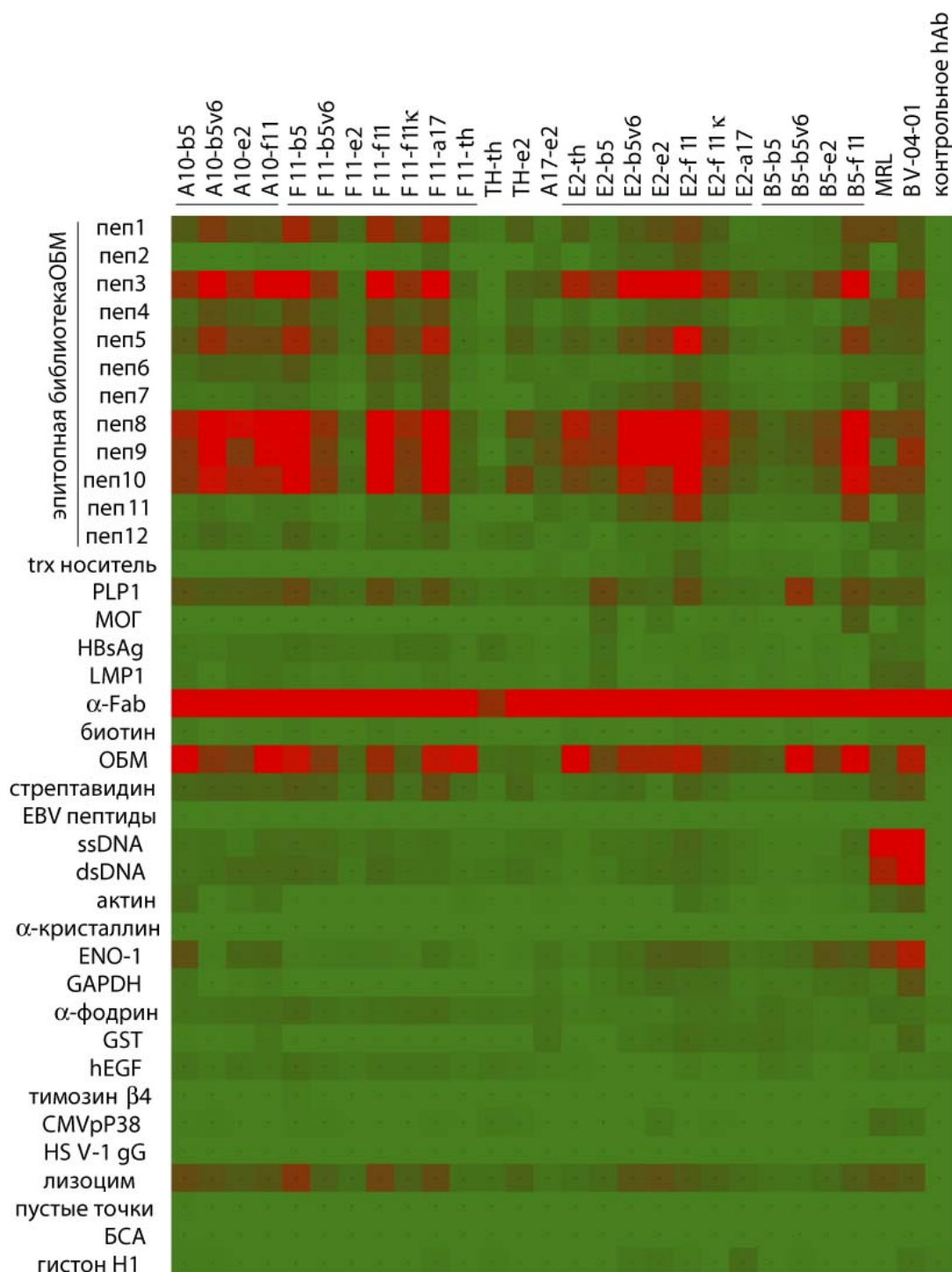
**Таблица 4. Изоэлектрические точки CDR3.** Цепи, помеченные <sup>1</sup> и <sup>2</sup> принадлежат иррелевантным антителам к фосфонату и тиреоглобулину соответственно.

HCh	CDR1		CDR2		CDR3		LCh	CDR1		CDR2		CDR3	
	a.a.	pI	a.a.	pI	a.a.	pI		a.a.	pI	a.a.	pI	a.a.	pI
<b>A10</b>	5	5.5	16	8.3	16	4.5	<b>b5</b>	14	3.8	7	9.7	10	5.2
<b>B5</b>	5	4.0	17	9.5	16	3.3	<b>b5v6</b>	13	8.4	7	4.4	10	5.1
<b>E2</b>	5	3.8	17	5.8	10	3.8	<b>e2</b>	10	8.3	7	4.2	9	5.2
<b>F11</b>	5	9.7	17	5.8	19	3.7	<b>f11</b>	13	5.2	7	9.4	11	4.2
<b>A17<sup>1</sup></b>	6	5.2	16	8.2	10	5.1	<b>a17<sup>1</sup></b>	13	5.2	7	8.8	10	3.8
<b>TH<sup>2</sup></b>	5	6.4	17	6.0	5	9.8	<b>th<sup>2</sup></b>	11	5.8	7	11.0	10	6.7

### **5.1 Изучение изменения уровня кроссреактивности в зависимости от комбинации цепей с использованием технологии Luminex**

Существует значительное количество работ, постулирующих, что различные пептиды, в большинстве своем вирусной или бактериальной природы, могут потенциально мимикрировать под эпитопы ОБМ [137, 138, 212-214]. В этой связи нам представлялось интересным охарактеризовать профиль кроссреактивности комбинированных антител к ОБМ. Для этого мы использовали технологию Luminex. На магнитные микросферы был иммобилизован ряд аутоантигенов при РС (ОБМ, МОГ, PLP1, ДНК), пептидная библиотека ОБМ, потенциальные аутоантигены при глаукоме (ENO-1, GST,  $\alpha$ -фодрин, актин,  $\alpha$ -кристаллин, GAPDH, тимозин  $\beta$ 4, hEGF), некоторые вирусные белки (EBV Imp1, HBsAg, CMVpP38, HSV-1 gG), а так же лизоцим и гистон H1. Результаты, представленные на **Рисунке 18**, свидетельствуют, что профиль кроссреактивности большинства исследуемых аутоантител в основном характеризуется связыванием основных белков и

пептидов. Более 70% всех комбинаций связывают лизоцим (pI 9.4) и PLP1 (pI 8.7).

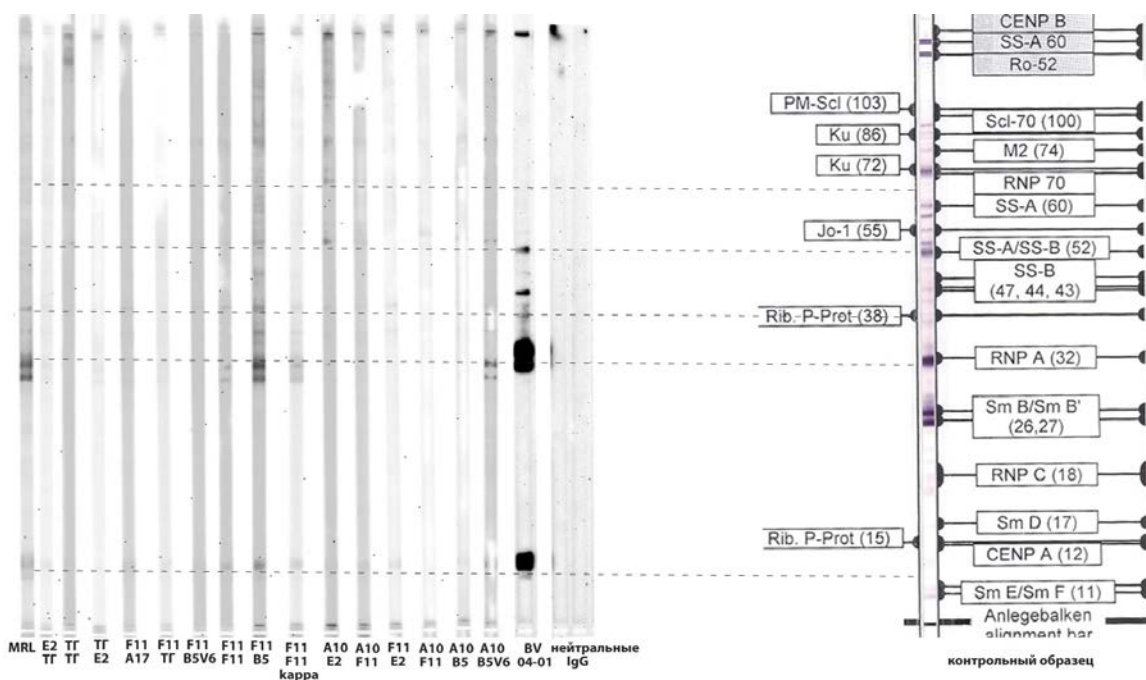


**Рисунок 18. Профиль кросс-реактивности аутоантител к ОБМ.** Исследовали изменения профиля кросс-реактивности от замены лёгких цепей по связыванию с эпитопной библиотекой ОБМ [9] и с 23 кандидатными аутоантигенами с помощью технологии Lumipex. Изменение цвета от зеленого до красного соответствует увеличению силы связывания. Заглавными и строчными буквы обозначены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> соответственно.

Сравнение комбинаций с одинаковой тяжелой цепью выявило, что кроссреактивность антитела довольно сильно зависела от спаренной лёгкой

цепи, в то время как связывание ОБМ в основном определялось тяжелой цепью. Например, ни одна тяжелая иррелевантная цепь в комбинации с лёгкой цепью анти-ОБМ антитела (ТН-Е2 и А17-Е2) не имела способности связывать ОБМ, с другой стороны, тяжелая цепь, специфичная к ОБМ, в паре с иррелевантной лёгкой цепью показывала высокую аффинность к ОБМ (F11-th и F11-A17).

Дополнительно для определения ауто- и поли-реактивности мы проанализировали связывание комбинационных антител с Нер-2 лизатом (Рис.19) [215]. В результате нами было показано, что тяжелая цепь F11 в паре почти со всеми вариантами лёгкой цепи обладала наибольшим кроссреактивным потенциалом. Аналогично, тяжелая цепь А10 в комбинации с лёгкой цепью V6, и в меньшей степени лёгкой цепью Е2, проявляла кроссреактивность с Нер-2 тестом.



**Рисунок 19.** Определение аутореактивности антител к ОБМ с помощью Вестерн-блоттинга анализа Нер-2 лизата. Основные области связывания находятся в районе 32 кДа (RNP A – маркер при синдроме Шарпа, системной красной волчанке), 38 кДа (Rib. P-Prot – маркер при системной красной волчанке), 50 кДа (SS-B – маркер при синдроме Шегрена, системной красной волчанке), 12 кДа (CENP A – маркер при прогрессивном системном склерозе).

Комбинационные антитела связывали маркеры таких аутоиммунных неврологических заболеваний как синдром Шарпа (*англ.* Sharp's syndrome или mixed connective tissue disease), синдром Шегрена (*англ.* Sjorgen's syndrome),



прогрессивный системный склероз (*англ.* Progressive systemic sclerosis)). Таким образом, можно предположить, что при аутоиммунной патологии образуются антитела, которые одновременно могут связывать множество аутоантигенов и, тем самым, влиять на ход заболевания.

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

Для определения различий в аффинности полученных комбинаций анти-ОБМ антител, первым этапом мы решили использовать метод ИФА, где первым слоем наносили ОБМ, а исследуемые антитела наносились вторым слоем в различных концентрациях от 30 до 0.1 мкг/мл (**Рис.20**).

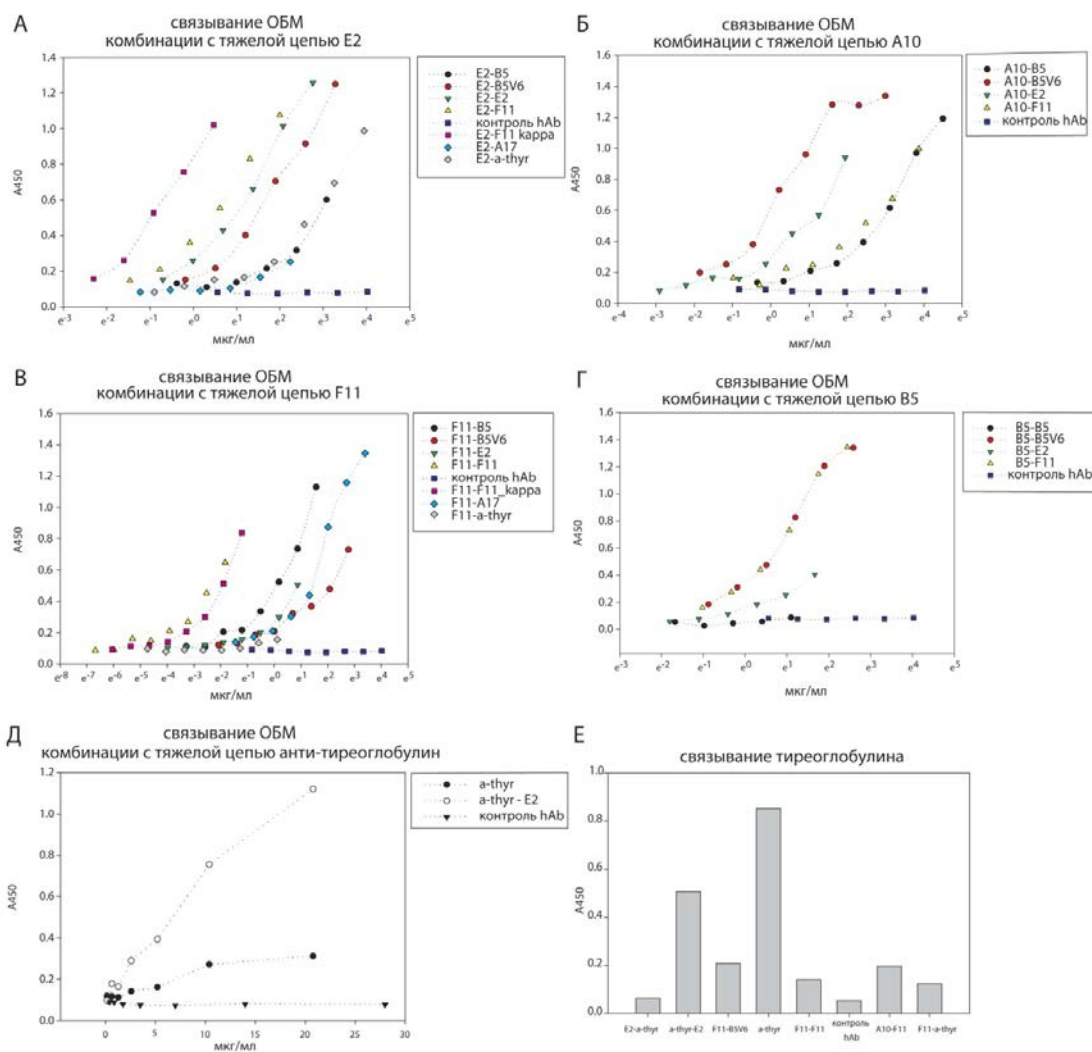
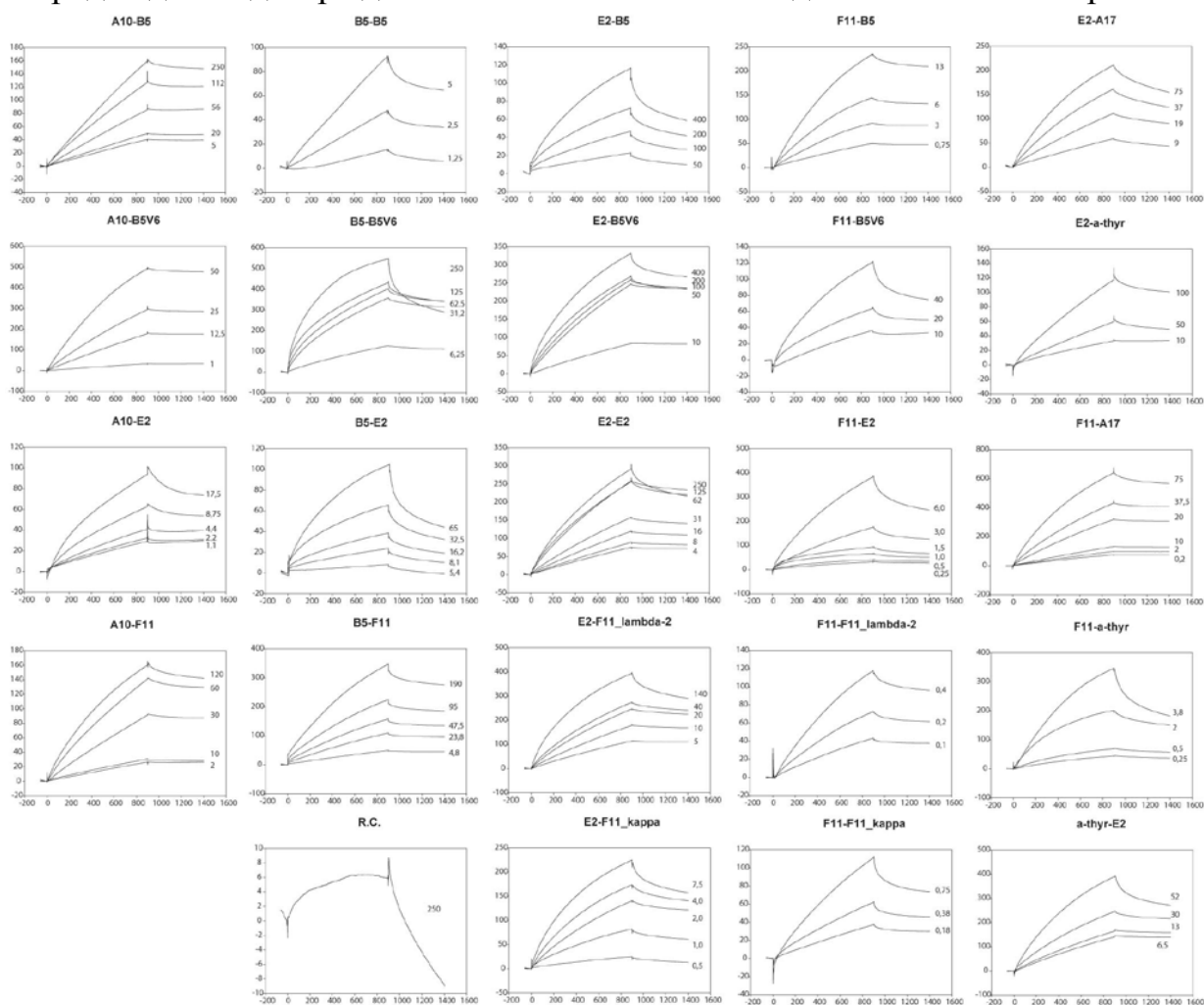


Рисунок 20. ИФА (А-Д) связывание ОБМ, (Е) связывание тиреоглобулина

Все исследуемые комбинации, содержащие хоть одну цепь, специфичную к ОБМ, показали его связывание, отличное от отрицательных контролей. Уровень связывания вариантов с иррелевантными цепями (E2-a17, E2-th, F11-a17, F11-th и th-E2) был значительно ниже. Стоит заметить, что в некоторых случаях присутствие одной лёгкой цепи анти-ОБМ антитела в комбинации с иррелевантной тяжелой цепью (th-E2) было достаточным для узнавания ОБМ (Рис.20 Д).

Далее для более точной и достоверной характеристики силы связывания исследуемых антител мы использовали технику поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Для этого препарат ОБМ был ковалентно иммобилизован за аминокислоты на поверхности соответствующего чипа (см. методы). Образцы антител наносили в потоке при различных концентрациях в произвольном порядке для подтверждения независимости последовательных экспериментов



**Рисунок 21. Изменение аффинности к ОБМ при варьировании тяжелых и лёгких цепей согласно результатам ППР (BIAcore)**

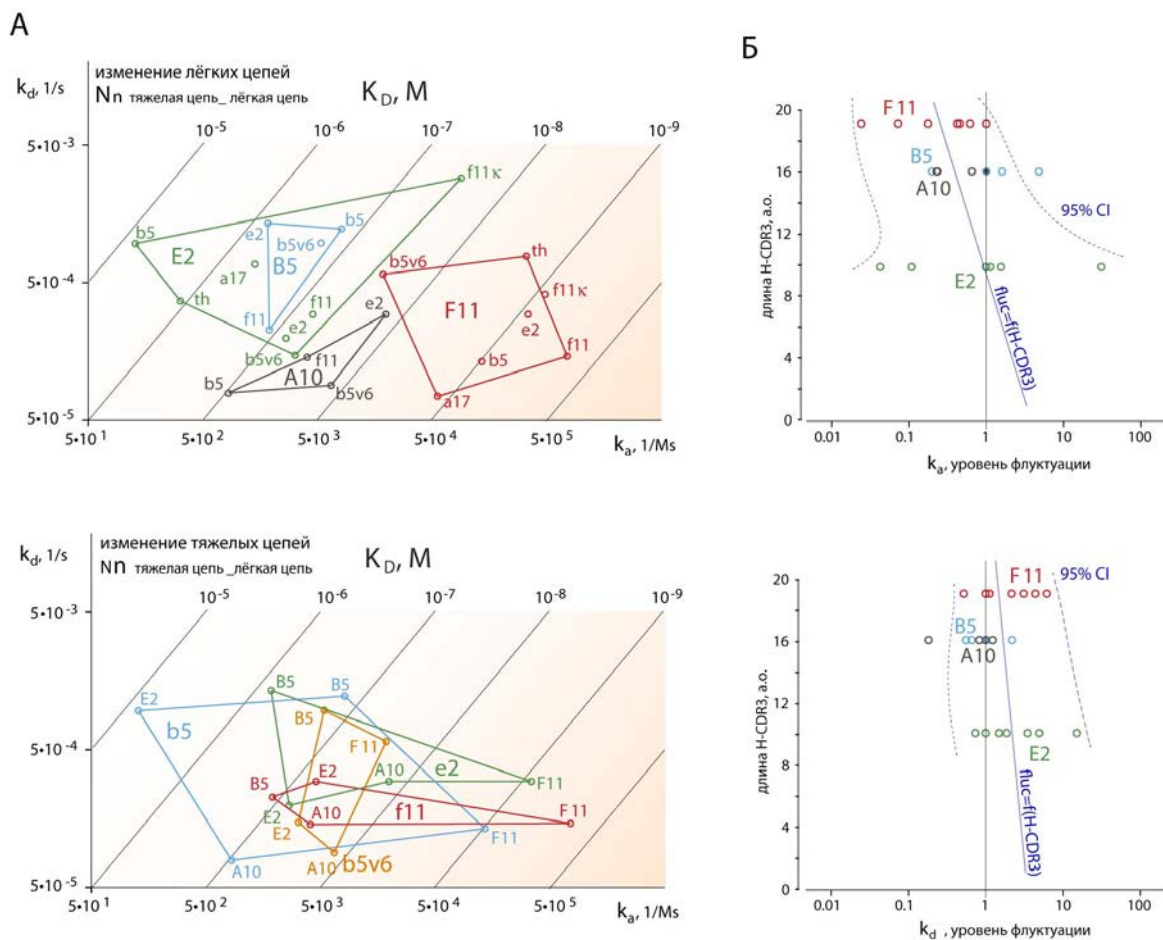
друг от друга. На одном чипе проводили не более 10 экспериментов, так как при большем числе последовательных регенераций поверхности чипа результаты становились недостоверными, возможно из-за нарушения фолдинга ОБМ. Сенсограммы связывания антител с ОБМ представлены на **Рисунке 21**.

При расчете динамических констант связывания ( $k_a/k_d$ ) мы учитывали сенсограммы полной раститровки, так как значения, полученные при обработке одной кривой, могут на порядок отличаться от реальных констант связывания и диссоциации. Итоговые результаты приведены в **Таблице 5**. Для более наглядной визуализации результатов мы построили графики (**Рис.22 А**), в координатах  $k_a - k_d$  где дополнительно проведены линии фиксированных значений  $K_D$ , соответствующие частному  $k_a$  и  $k_d$ . Из **Рисунка 22** очевидно, что

**Таблица 5. Константы диссоциации связывания исследуемых антител с ОБМ.**

Комбинация антитела	$k_a$ , 1/Ms	$k_d$ , 1/s	$K_D$ , M
A10-B5	$8.0 \times 10^2$	$7.9 \times 10^{-5}$	$9.9 \times 10^{-8}$
A10-B5V6	$6.1 \times 10^3$	$9.0 \times 10^{-5}$	$1.5 \times 10^{-8}$
A10-E2	$1.8 \times 10^4$	$3.0 \times 10^{-4}$	$1.7 \times 10^{-8}$
A10-F11	$3.8 \times 10^3$	$1.5 \times 10^{-4}$	$3.8 \times 10^{-8}$
F11-B5	$1.2 \times 10^5$	$1.4 \times 10^{-4}$	$1.1 \times 10^{-9}$
F11-B5V6	$1.7 \times 10^4$	$5.9 \times 10^{-4}$	$3.5 \times 10^{-8}$
F11-E2	$3.0 \times 10^5$	$3.0 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-9}$
F11-F11 $\lambda_2$	$6.5 \times 10^5$	$1.5 \times 10^{-4}$	$1.7 \times 10^{-9}$
F11-F11	$4.2 \times 10^5$	$4.2 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-9}$
F11-A17	$5.0 \times 10^4$	$7.5 \times 10^{-5}$	$1.5 \times 10^{-9}$
F11-th	$2.9 \times 10^5$	$8.0 \times 10^{-4}$	$2.8 \times 10^{-9}$
TH-E2	$9.0 \times 10^3$	$8.0 \times 10^{-4}$	$8.9 \times 10^{-8}$
E2-th	$3.1 \times 10^2$	$3.8 \times 10^{-4}$	$1.2 \times 10^{-6}$
E2-A17	$1.4 \times 10^3$	$7.0 \times 10^{-4}$	$5.2 \times 10^{-7}$
E2-B5	$1.3 \times 10^2$	$1.0 \times 10^{-3}$	$7.9 \times 10^{-6}$
E2-B5V6	$3.0 \times 10^3$	$1.5 \times 10^{-4}$	$5.0 \times 10^{-8}$
E2-E2	$2.5 \times 10^3$	$2.0 \times 10^{-4}$	$8.0 \times 10^{-8}$
E2-F11 $\lambda_2$	$4.3 \times 10^3$	$3.0 \times 10^{-4}$	$7.1 \times 10^{-8}$
E2-F11	$8.0 \times 10^4$	$3.0 \times 10^{-3}$	$3.8 \times 10^{-8}$
B5-B5	$7.5 \times 10^3$	$1.3 \times 10^{-3}$	$1.7 \times 10^{-7}$
B5-B5V6	$5.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^{-3}$	$2.0 \times 10^{-7}$
B5-E2	$1.8 \times 10^3$	$1.4 \times 10^{-3}$	$8.0 \times 10^{-7}$
B5-F11	$1.8 \times 10^3$	$2.3 \times 10^{-4}$	$1.3 \times 10^{-7}$
A17-E2			нет связывания

(1) в целом диапазон изменения  $k_a$  больше, чем таковой для  $k_d$ ; (2) для кластеров, образованных иммуноглобулинами с одинаковыми  $V_H$ , но разными  $V_L$  характерен меньший разброс значений  $k_a$  и  $k_d$ , чем для вариантов с разными  $V_H$  и одинаковыми  $V_L$ . Данный факт приводит к тому, что в случае одинаковых тяжелых цепей кластеры пролегают вдоль линий фиксированных  $K_D$ , а не перпендикулярно им. Это свидетельствует о существенно меньшем разбросе результирующей  $KD$  у комбинаций антител с одинаковой тяжелой цепью, а значит, более стабильной аффинностью по отношению к ОБМ. Важно, что диапазон колебания  $k_a$  явно уменьшается при увеличении длины H-CDR3 (рис.22 Б).

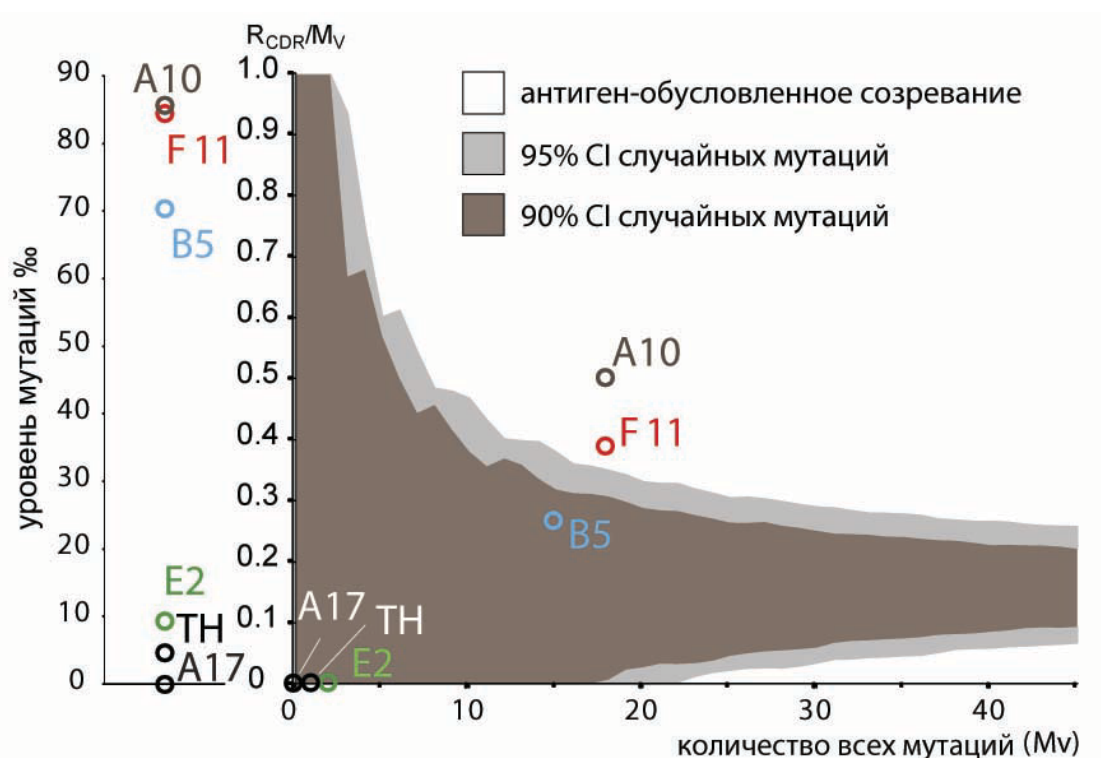


**Рисунок 22. Изменение аффинности к ОБМ при варьировании тяжелых и лёгких цепей согласно результатам ППР (BIACORE).**

## 5. Биоинформатический анализ аутореактивных IgG

Для более полного понимания природы образования патогенных антител к ОБМ мы хотели прояснить, являются ли отобранные антитела продуктом

антиген-обусловленного созревания или всего лишь результатом случайного мутагенеза. Для этого последовательности тяжёлых цепей антител, отобранных к ОБМ, и контрольных антител (A17, ТГ) были проанализированы для определения вероятности именно соматических гипермутаций, а не случайных мутаций до встречи В-клеток с патогеном. На **Рисунке 23** показана частота соматических мутаций на каждые 1000 п.о. и собственно сама вероятность антиген-обусловленного созревания. Для ее оценки учитывалось отношение замен в Н-CDR1 и Н-CDR2 ( $R_{CDR}$ ) к общему числу мутаций в переменном регионе ( $M_V$ ). Коричневая и серая области соответствуют 90% и 95% доверительными интервалами области случайных мутаций. Таким образом, точки, выходящие за эти области, имеют повышенное содержание направленных замен гипервариабельных участках, что можно считать результатом взаимодействия с антигеном.



**Рисунок 23.** Частота соматических мутаций на 1000 п.о. (левый рисунок) и анализ антиген-обусловленного созревания антител (правый рисунок). Отношение мутационных замен в Н-CDR1 и Н-CDR2 ( $R_{CDR}$ ) к общему числу мутаций в переменном регионе ( $M_V$ ) относительно  $M_V$ . Серая и коричневая области соответствуют 95% и 90% вероятности случайной мутации. Расположение точки над верхней границей доверительного интервала, является признаком антиген-обусловленного созревания.

Результаты анализа свидетельствуют о том, что два (A10 и F11) из четырех исследованных клонов стали специфически связывать ОБМ после встречи с антигеном, которым вероятно мог служить белок вирусной или бактериальной природы, что подтверждает теорию молекулярной мимикрии.

В ходе данной работы мы так же проанализировали представленность и структуру антител, отобранных на основные аутоантигены РС – ОБМ и МОГ, а также на вирусный белок LMP-1. С этой целью мы дополнительно провели по два раунда обогащения на МОГ и LMP-1 (на ОБМ обогащение проведено ранее), а для поиска кроссреактивных антител – последовательно два раунда биопэннинга на LMP-1, а затем два раунда на ОБМ. Все обогащения проводили под контролем поликлонального ИФА. После процедуры селекции мы проанализировали полученные одноцепочечные антитела в составе фаговых частиц методом моноклонального ИФА. Клон считали положительным, если его сигнал на связывание с одним или двумя антигенами в ИФА превышал минимум в 3 раза сигнал бактериофага M13K07, используемого в качестве отрицательного контроля (в титре  $10^{13}$  фаговых частиц/лунку). Способность конкретных фаговых клонов связывать оба антигена подтверждена путем проведения не менее трех независимых ИФА.

В результате было отобрано несколько фаговых клонов, несущих одноцепочечные антитела, которые наиболее эффективно связывали LMP-1 или LMP-1/ОБМ. В **таблице 6** приведены данные по относительной силе связывания фаговых клонов с исследуемыми антигенами, а также аминокислотные последовательности их гипервариабельных участков и принадлежность к зародышевым семействам. Интересно, что относительная сила связывания анти-LMP-1-антител со своим антигеном значительно превышает относительную силу связывания с обоими антигенами потенциально кроссреактивных анти-LMP-1/-анти-ОБМ-антител (**таблица 6**). Эти наблюдения могут отражать природную ситуацию, происходящую при развитии РС, когда первично образованные антитела на какой-либо патоген (в частности, ВЭБ) в дальнейшем могут при попадании в ЦНС (при наличии

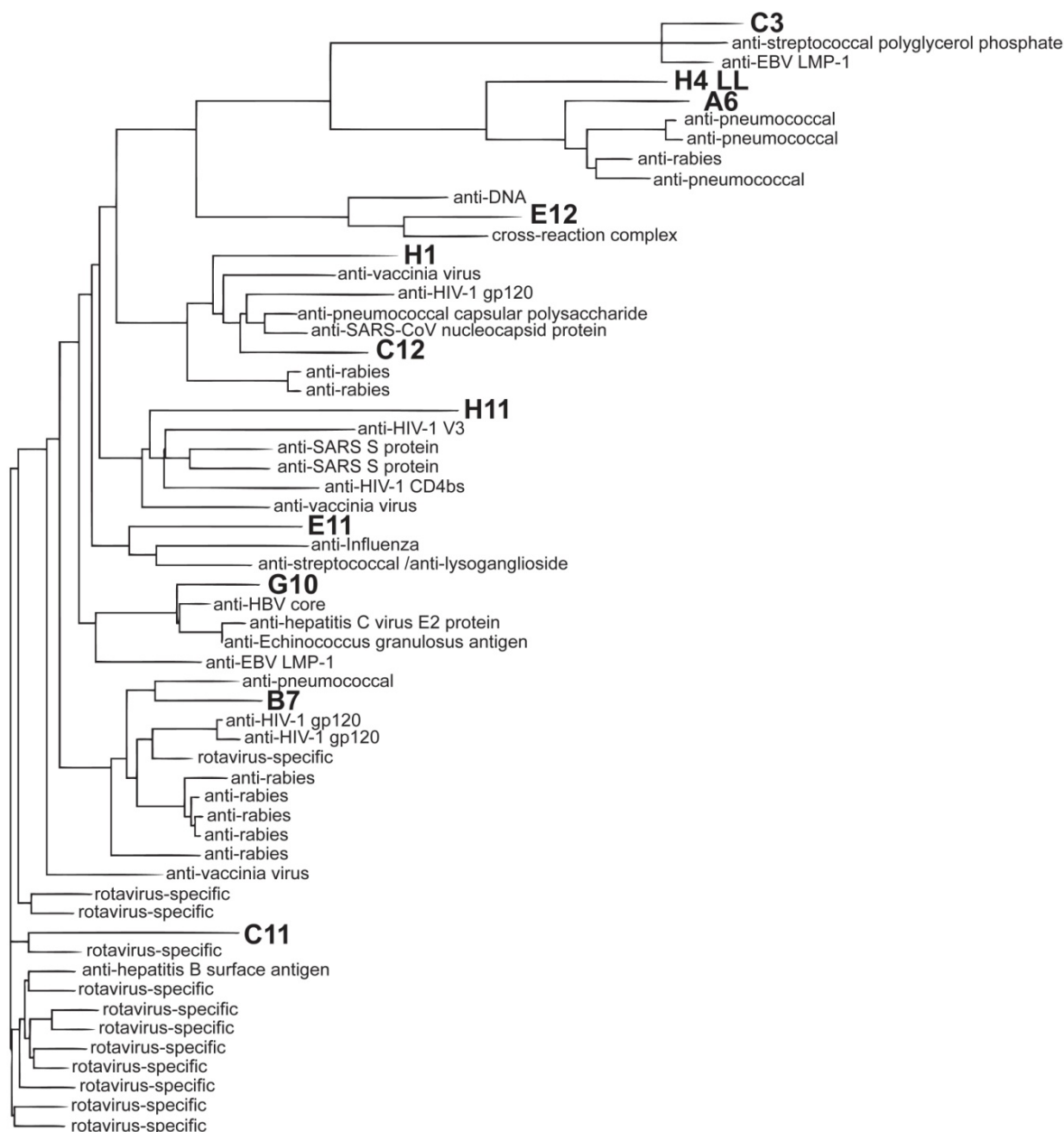
поврежденного гематоэнцефалического барьера (ГЭБ)) взаимодействовать с ОБМ, вызывая деградацию миелиновой оболочки. По-видимому, способность таких антител к потенциальной полиреактивности, пусть и при слабом связывании, предпочтительней высокой специфичности с сильной аффинностью.

**Таблица 6. Одноцепочечные антитела, отобранные после двух раундов фагового дисплея на соответствующие антигены.** LL в названии клона обозначает, что клон отобран на LMP-1. Относительное связывание с антигенами рассчитывалось как отношение сигнала ИФА связывания с антигеном определенного фагового клона к сигналу отрицательного контроля M13KO7,  $\pm$  превышение над фоном в 1.5 и более раза; + превышение в 3 раза; ++ превышение в 6 раз; +++ превышение в 9 и более раз. Описанные клоны показывали достоверное связывание с антигенами минимум в 3 независимых экспериментах.

Имя клона	Vh	Dh	Jh	H-CDR3	VL	JL	L-CDR3	связывание	
								с LMP-1	с ОБМ
<b>Отбор на LMP-1 / ОБМ</b>									
b7	IGHV1-2*04	IGHD1-26*01	IGHJ4*02	VRGSTYSPSGYFEY	IGKV5-2*01	IGKJ2*01	LQHDNFP	+	++
g10	IGHV1-3*01	IGHD6-13*01	IGHJ4*02	ARIFEGLSGIAAPFDY	IGKV4-1*01	IGKJ4*01	QQYFSSPLT	+	$\pm$
h1	IGHV1-8*01	IGHD4-17*01	IGHJ6*03	AREVSDYSDYGDVYMDV	IGKV3-20*01	IGKJ5*01	QQYCCSPIT	$\pm$	$\pm$
e11	IGHV1-8*01	IGHD4-17*01	IGHJ6*03	AREVSDYSDYGDVYMDV	IGLV1-44*01	IGLJ3*02	AAWDGSLNGP	$\pm$	$\pm$
h11	IGHV1-18*04	IGHD3-3*02	IGHJ2*01	ARREELYTTSPGYFGV	IGLV3-21*03	IGLJ7*02	RVWDKQIVSRSG	$\pm$	+
e12	IGHV1-46*01	IGHD4-11*01	IGHJ6*02	ARRGFDY	IGKV1-33*01	IGKJ1*01	LQFYEFPYT	$\pm$	$\pm$
c11	IGHV1-46*03	IGHD5-12*01	IGHJ6*03	AKDLRPRDIGDMDV	IGKV1-39*01	IGKJ5*01	QQSYSSP	$\pm$	+
c12	IGHV1-69*06	IGHD1-26*01	IGHJ6*02	ARCGILRSHYFYGMVDV	IGLV1-47*01	IGLJ7*01	AAWDDSLSG	$\pm$	+
a6	IGHV3-7*01	IGHD4-11*01	IGHJ6*02	VRGGLGAGADY	IGLV4-69*01	IGLJ7*01	QITWGTGI	+	++
c3	IGHV4-b*01	IGHD2-21*01	IGHJ5*01	AGLTQSSHDAN	IGKV2-30*01	IGKJ1*01	MQATHWP	$\pm$	+
f11 (=e1 LL)	-	-	-	-	IGLV1-47*01	IGLJ3*02	VAWDDNLSG	$\pm$	$\pm$
c2	-	-	-	-	IGLV3-1*01	IGLJ7*01	AAWDDSLNGPV	$\pm$	$\pm$
d1	-	-	-	-	IGLV6-57*01	IGLJ7*01	QSYNTSLI	$\pm$	$\pm$
a1	-	-	-	-	IGLV10-54*01	IGLJ3*02	SVWDDSSLSA	$\pm$	$\pm$
<b>отбор на LMP-1</b>									
h4 LL	IGHV3-23*01	IGHD6-13*01	IGHJ2*01	AKDIAAAATPEY	IGKV3-11*01	IGKJ5*01	QQRSNWPPT	+++	h.o.
c12 LL	IGHV5-51*01	IGHD4-17*01	IGHJ4*03	ARFYDSTGSCDY	IGKV1D-33*01	IGKJ2*02	SIQXKFLXC	+++	h.o.
d4 LL, g3 LL, b3 LL	-	-	-	-	IGLV1-47*01	IGLJ7*01	AAWDDSLSG	+++	h.o.
e1 LL (=f11)	-	-	-	-	IGLV1-47*01	IGLJ3*02	VAWDDNLSG	+++	h.o.
d2 LL (=a1)	-	-	-	-	IGLV10-54*01	IGLJ3*02	SVWDDSSLSA	+++	h.o.

Поиск гомологов отобранных моноклональных антител проводили по аминокислотным последовательностям с помощью баз данных Protein Data Bank proteins (pdb), UniProtKB/Swiss-Prot (swissprot) и программы protein BLAST. На рисунке 24 и 25 представлены данные по относительной гомологии между структурами полученных нами антител и иммуноглобулинами, специфичными к белкам различных вирусов и бактерий. Выявлен высокий уровень сходства полученных антител с целым рядом

патоген-специфических антител (против вируса гриппа, вируса лихорадки Западного Нила, вируса бешенства, ротавируса, пневмококка, стрептококка и др.) как для тяжелой, так и для легкой цепей. Можно отметить высокий уровень структурного сходства полученных антител с антителами из ЦСЖ РС, анти-МОГ, анти-CD152 (антиген 4 цитотоксических лимфоцитов), антителами к белку Бенс-Джонса.



**Рисунок 24. Гомология тяжелых цепей отобранных антител с противовирусными антителами, известными из опубликованных данных (базы данных Protein Data Bank proteins (pdb), UniProtKB/Swiss-Prot (swissprot)). Жирным шрифтом отмечены антитела, отобранные в данной работе.**





Крайне интересны данные по близости структур тяжелых цепей кроссреактивных антител С3 и анти-LMP-1-антитела (gb|ABA55010.1 – гомология 91%), а также кроссреактивного G10 и анти-LMP-1-антитела (gb|ABA55014.1 – гомология 86%), что косвенно подтверждает корректность отбора антител из фаговой библиотеки. Среди легких цепей высокая гомология антитела В7 и МОГ-специфичного антитела (gb|AAУ15116.1 – гомология 90%) может свидетельствовать о полиреактивности отобранного антитела, а сходство А6 и антитела из ЦСЖ больного РС (gb|AAS21063.1 – гомология 94%) может косвенно подтверждать аутоиммунную природу отобранного нами антитела. На наш взгляд, высокая провирусная гомология антител, способных связывать ОБМ, потенциально указывает на то, что первичной мишенью для этих антител могут служить многие вирусные белки. Таким образом, для запуска РС и активации патогенных В-клеток, наряду с генетическими и экологическими факторами, необходимо наличие не определенного экзогенного патогена, а его способность, проникая в ЦНС, увлекать за собой клетки иммунной системы, что в итоге приводит к их «множественной и беспорядочной» активации. То есть антителосекретирующие клетки, активированные еще на периферии в лимфатических узлах, мигрируют через поврежденный ГЭБ. Таким образом, первичные антитела к вирусным антигенам начинают взаимодействовать с собственными кроссреактивными аутоантигенами в ЦНС, вызывая локальные воспаления и в дальнейшем развитие заболевания.

## **7. Широкомасштабное секвенирование.**

Параллельно с анализом функционально отобранных антител, для расширения панели исследуемых моноклонов и лучшей статистической достоверности мы использовали метод широкомасштабного секвенирования. С использованием оборудования Illumina MiSeq определено около 100 000 последовательностей из исходной библиотеки и из каждой пре-селектированной суб-библиотеки (по 50000 для тяжелых и легких цепей). Для них была проведена идентификация генотипа IgV, IgHD, and IgJ локусов. IgV

и CDR3 тяжелой или лёгкой цепи были обнаружены практически во всех клонах. Последовательности без CDR3 исключались из дальнейшего анализа. Основные параметры проведенного секвенирования представлены на **Рисунке 26 А**. Всего из пяти библиотек получили 44357 последовательностей для тяжелых цепей иммуноглобулинов и 49001 последовательностей для лёгких цепей, включая 24476 для каппа и 24525 для лямбда цепей. После исключения повторностей осталось 20674 уникальных  $V_H$  и 26242 уникальных  $V_L$ . Количество уникальных последовательностей для каждой отдельной библиотеки варьировалось от 2499 до 10074 для  $V_H$  и от 857 до 8466 для  $V_L$ .

А

тяжелые цепи (Hc)	PC	ОБМ	МОГ	LMP1-ОБМ	LMP1	всего
Hc кол-во прочтений	44027	46925	36655	36449	57730	221786
Hc уникальные CDR3	10074	7088	3013	2499	5461	20674
Hc кластеры	4539	2605	488	584	2049	7907
искусственные библиотеки	PC	ОБМ+	МОГ+	LMP1-ОБМ+	LMP1+	
Hc кластеры	4539	734	292	371	779	
Hc уникальные CDRs	7445	1230	778	868	1509	
germline VH гены	53	48	36	37	44	
лёгкие цепи (Lc)	PC	ОБМ	МОГ	LMP1-ОБМ	LMP1	Всего
Lc кол-во прочтений	49669	53038	52406	43492	46405	245010
кол-во прочтений κ	21731	33758	30312	25035	11546	122382
кол-во прочтений λ	27938	19280	22094	18457	34859	122628
уникальные CDR3 λ	8466	4719	1266	2012	4037	14985
уникальные CDR3 κ	6841	3948	857	1254	2729	11257

Б

Критерии создания искусственно-обогащенных библиотек

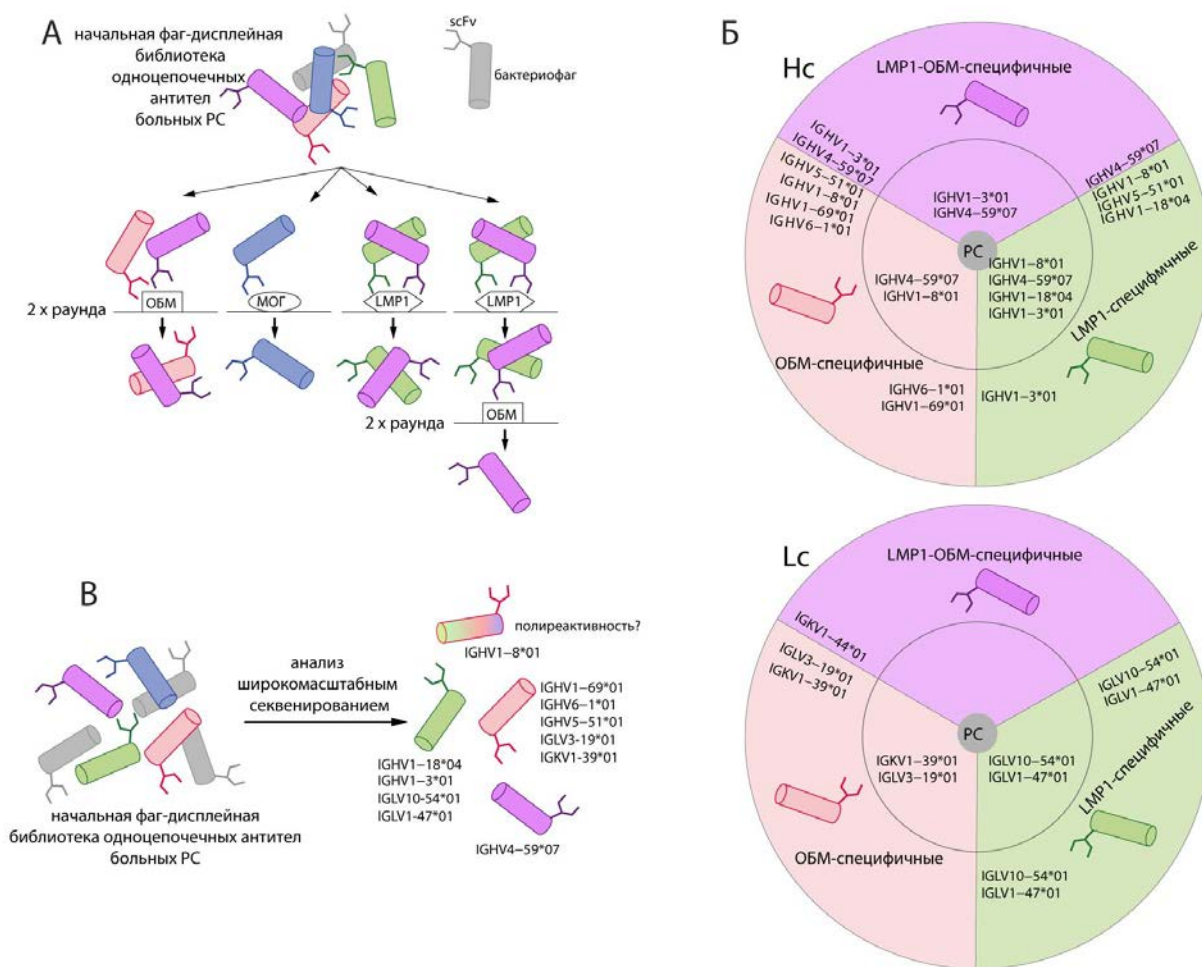
LMP1/ОБМ+	МОГ+	LMP1+	ОБМ+
LMP / ОБМ > LMP	МОГ > LMP / ОБМ * 1.5	LMP > LMP / ОБМ	ОБМ > PC
LMP / ОБМ > МОГ * 2	МОГ > ОБМ * 1.5	LMP > МОГ * 1.8	ОБМ > МОГ * 2

**Рисунок 26. (А) Основные характеристики полученных генов IGHV и IGLV для полученных библиотек и (Б) критерии создания искусственно-обогащенных библиотек.**

Полученные в результате широкомасштабного секвенирования последовательности были выровнены с последовательностями антител из базы данных IMGT [216] с помощью программы IMGT/V-QUEST [217], а затем результаты выравниваний были отфильтрованы для избавления от артефактов (процент гомологии с предсказанным зародышевым семейством

должен был составлять не менее 70%, функциональность последовательности и критерий «одна аллель – для одного гипервариабельного участка»). В дальнейшем анализировали только отфильтрованные результаты секвенирования.

Для анализа эффективности отбора были проведены 8 сравнений: каждая обогащенная библиотека против исходной библиотеки РС, LMP1/ОБМ против ОБМ и LMP1 библиотек, МОГ против ОБМ и LMP1 против ОБМ библиотеки. Для каждой пары библиотек применяли линейный анализ для сравнения представленности всех аллелей в этих двух библиотеках.

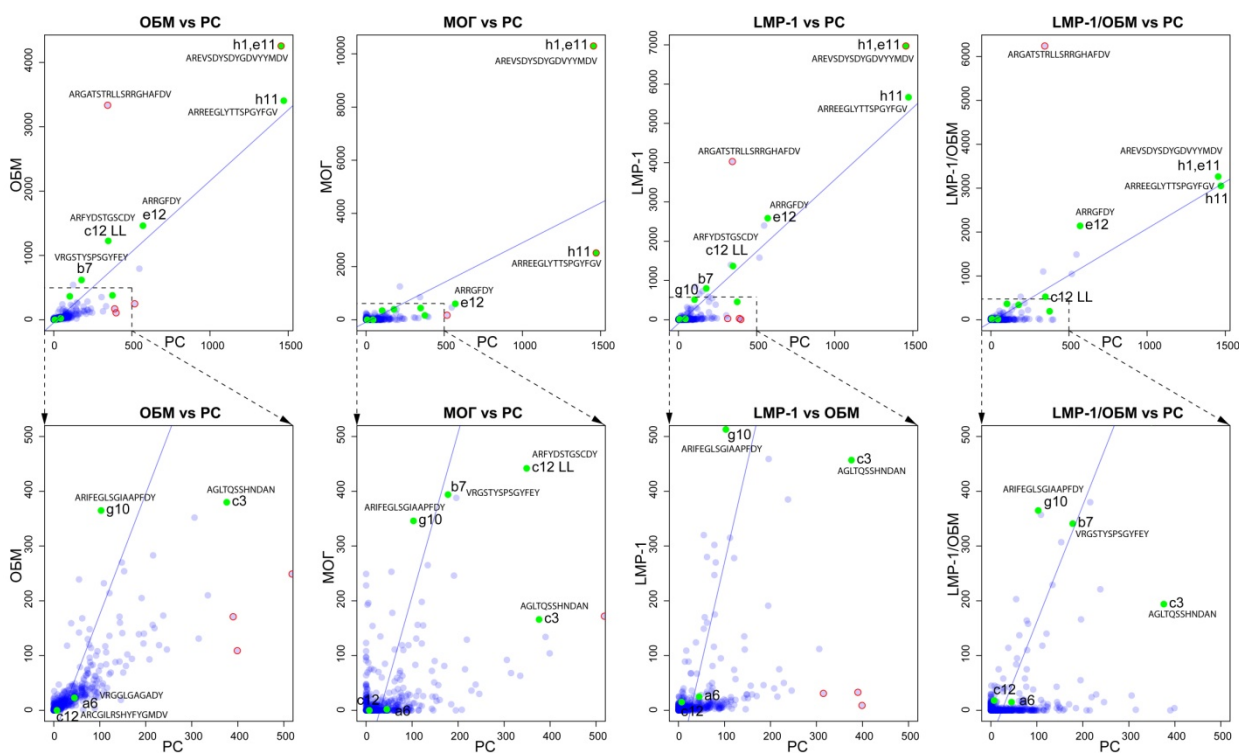


**Рисунок 27. Описание фаг-дисплейных библиотек одноцепочечных антител, обогащенных на ОБМ, LMP-1 и МОГ, с помощью метода широкомасштабного секвенирования. (А) Схема обогащения фаг-дисплейной библиотеки РС одноцепочечных антител. (Б) Преобладание специфических зародышевых семейств в отдельных библиотеках по сравнению с остальными для  $V_H$  (верхняя диаграмма) и  $V_L$  (нижняя диаграмма). Здесь и на рис (В) подписанные зародышевые семейства, являющиеся аутлайнерами при попарном сравнении библиотек. (В) Выявление из исходной библиотеки РС специфических зародышевых семейств, для которых намечена тенденция к взаимодействию с различными антигенами. Здесь и на рисунке 24, 29 обогащенные библиотеки на ОБМ выделены розовым, на LMP-1 салатовым, а одновременно на ОБМ и LMP-1 сиреневым цветом.**

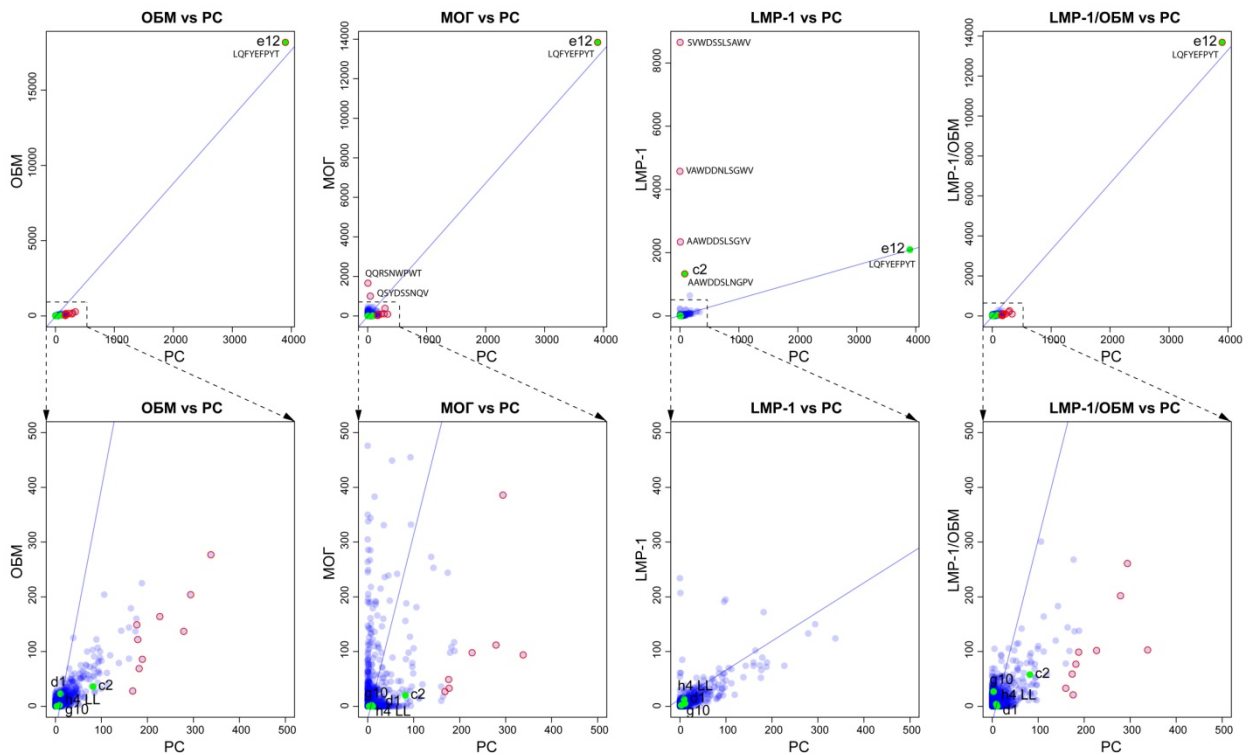
В результате (**рис.27 Б, В**) зародышевые семейства IGHV1-3\*01, IGHV1-18\*04, IGLV10-54\*01, IGLV1-47\*01 были определены как LMP1-реактивные; IGHV1-69\*01, IGHV5-51\*01, IGHV6-1\*01 и IGLV3-19\*01, IGKV1-39\*01 как ОБМ-реактивные; IGHV4-59\*07 показал кроссреактивные характеристики, а для IGHV1-8\*01 были обнаружены полиреактивные свойства, так как это семейство было обнаружено во всех обогащенных библиотеках.

Далее был проведен анализ отобранных антител по встречаемости CDR3 для тяжелых и легких цепей, а также определены абсолютные заряды наиболее эффективно отобранных CDR3. Сравнительному анализу подвергали представленность различных CDR3 в обогащенных библиотеках по сравнению с начальной библиотекой РС, считая мерой представленности CDR3 общее число последовательностей, несущих этот CDR3 (**рис.28, 29**). На **Рисунках 28, 29** приведена представленность CDR3-антител, полученных с помощью функционального отбора (**таблица 6**). Точки выброса, находящиеся выше регрессионной линии, соответствуют положительному отбору на данный CDR3 (он значительно преобладает в этом отборе по сравнению с остальными CDR3), а точки выброса ниже этой линии – отрицательному отбору на них. Нас, в первую очередь, интересовали положительные выбросы, так как они были первыми кандидатами на функционально значимые CDR3 в каждом отборе. Как и ожидалось, среди распространенных (по количеству встречаемости) CDR3 преобладает большая часть клонов, выбранных после функционального отбора с помощью моноклонального фагового ИФА. Причем видно, что клоны h1 и e11 имеют CDR3 тяжелой цепи, обладающий повышенной полиреактивностью, так как частота его встречаемости увеличена во всех четырех обогащенных библиотеках по сравнению с исходной. CDR3 клона h11 амплифицировался в библиотеках ОБМ, LMP-1, LMP-1/ОБМ, что может характеризовать его как часть кроссреактивного паратопа для двух общих эпитопов именно у ОБМ и LMP-1. С другой стороны, довольно интересной представляется ситуация, когда согласно анализу встречаемости H-CDR3 явный отбор по связыванию ОБМ и LMP-1 прошла последовательность ARGATSTRLLSRRGHAFDV, но методом

моноклонального фагового ИФА мы не получили ни одного антитела с таким CDR3. Возможным объяснением может служить ограниченное число клонов, анализируемое при фаговом ИФА вручную. Подобная ситуация может возникнуть и в результате невысокой аффинности конкретного фагового клона к двум антигенам в формате моноклонального ИФА (низкий сигнал при ИФА), в результате чего данный клон не был выбран для дальнейшего анализа. Среди легких цепей потенциальной повышенной кроссреактивностью между ОБМ и МОГ обладал CDR3 клона  $\epsilon 12$ . При этом он был эффективно отобран и в библиотеке LMP-1/ОБМ после обогащения на ОБМ, хотя при одиночном обогащении на LMP-1 не наблюдалось эффективного отбора на данный CDR3.



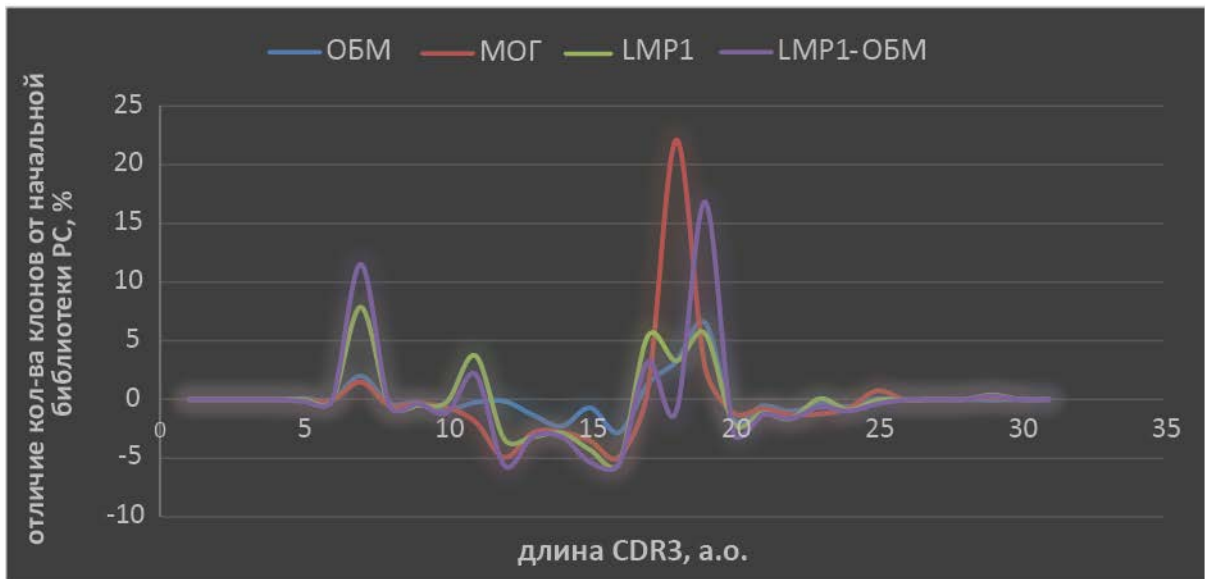
**Рисунок 28.** Сравнение встречаемости CDR3 тяжелых цепей в обогащенных библиотеках по сравнению с исходной библиотекой PC. На представленных точечных диаграммах каждая точка обозначает CDR3 с определенной последовательностью; по оси X отложено количество прочтений для этого CDR3 в библиотеке PC, а по оси Y – в соответствующей обогащенной библиотеке. Для каждой пары PC-отбора проведен регрессионный анализ, отмечены точки выброса с помощью пакета 'sa' языка R (помечены красным). Также на графиках отмечены экспериментально исследованные клоны, отобранные с помощью моноклонального фагового ИФА (зеленый цвет с указанием индивидуальной маркировки, приведенной в табл.5). Указаны последовательности CDR3 наиболее интересных клонов.



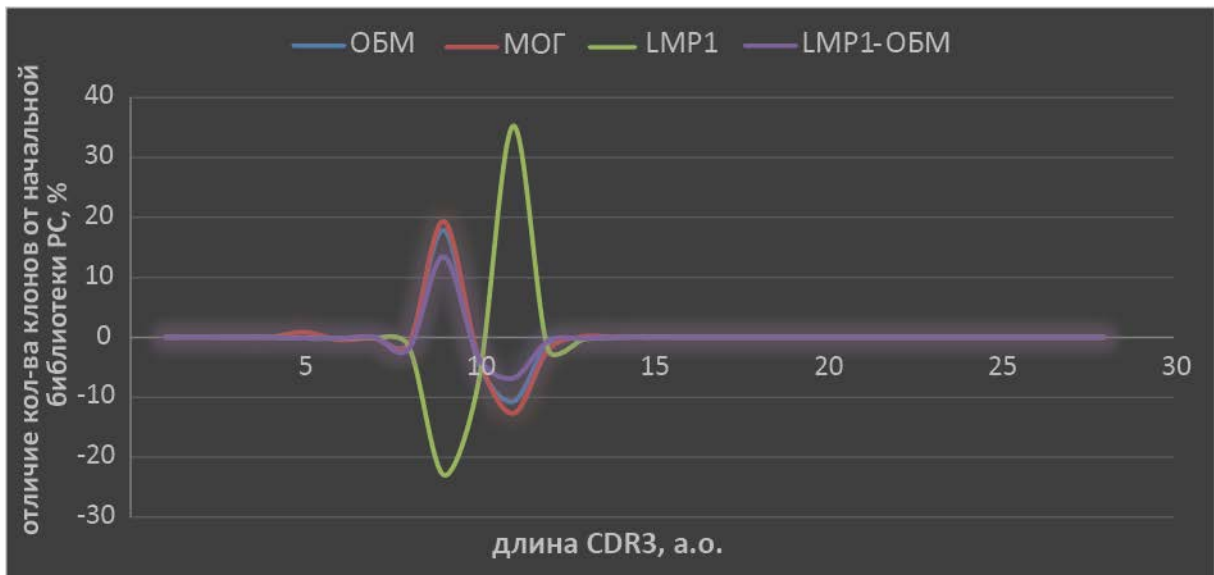
**Рисунок 29.** Сравнение встречаемости CDR3 легких цепей в обогащенных библиотеках по сравнению с исходной библиотекой PC. На представленных точечных диаграммах каждая точка обозначает CDR3 с определенной последовательностью; по оси X отложено количество прочтений для этого CDR3 в библиотеке PC, а по оси Y – в соответствующей обогащенной библиотеке. Для каждой пары PC-отбора проведен регрессионный анализ и отмечены точки выброса с помощью пакета 'car' языка R (помечены красным). На графиках отмечены экспериментально исследованные клоны, отобранные с помощью моноклонального фагового ИФА (зеленый цвет с указанием индивидуальной маркировки, приведенной в *табл.5*). Указаны последовательности CDR3 наиболее интересных клонов.

Дополнительно мы проанализировали, как изменяется длина CDR3 в процессе обогащения по сравнению с исходной библиотекой. При этом мы учитывали частоту встречаемости каждого уникального клона. На **Рисунке 30** изображено отношение процентного количества (состава) клонов с определенной длиной CDR3 из обогащенной библиотеки к исходной библиотеке PC для тяжелых (А) и легких (Б) цепей. Видно, что для тяжелых цепей при обогащении на МОГ характерно увеличения числа антител с CDR3 длиной 18 а.а., а для кросс-реактивных клонов к ОБМ и LMP1 увеличение CDR3 с длиной 7 или 19 а.о. Интересно, что по отдельности для LMP1 характерно увеличение CDR3 с длиной 7 а.о., а для ОБМ – с 19 а.о., то есть кроссреактивные клоны объединили эти характеристики.

А



Б



**Рисунок 30.** Изменение в распределении длин CDR3 в зависимости от связываемого антигена для (А) тяжелых и (Б) лёгких цепей. Распределение исходной библиотеки РС принималось за базовую линию (0). График показывает разницу в частоте встречаемости CDR3 (в %) между обогащенными библиотеками и исходной библиотекой РС (ось Y) как функцию от длины CDR3 (ось X).

Итоговое количество обнаруженных IgHV варьируется от 36 до 54, включая 4 псевдогена и 12 непрофильных генов (noncore genes), то есть гены, которые встречаются только у некоторых, а не у всех индивидуумов [218, 219]. Значимое увеличение встречаемости по сравнению с предыдущими данными по здоровым донорам [219] было обнаружено для IGHV1-24, IGHV1-69, IGHV1-8, IGHV5-51, и IGHV6-1 (**Таблица 7**). Сравнительный анализ показал,

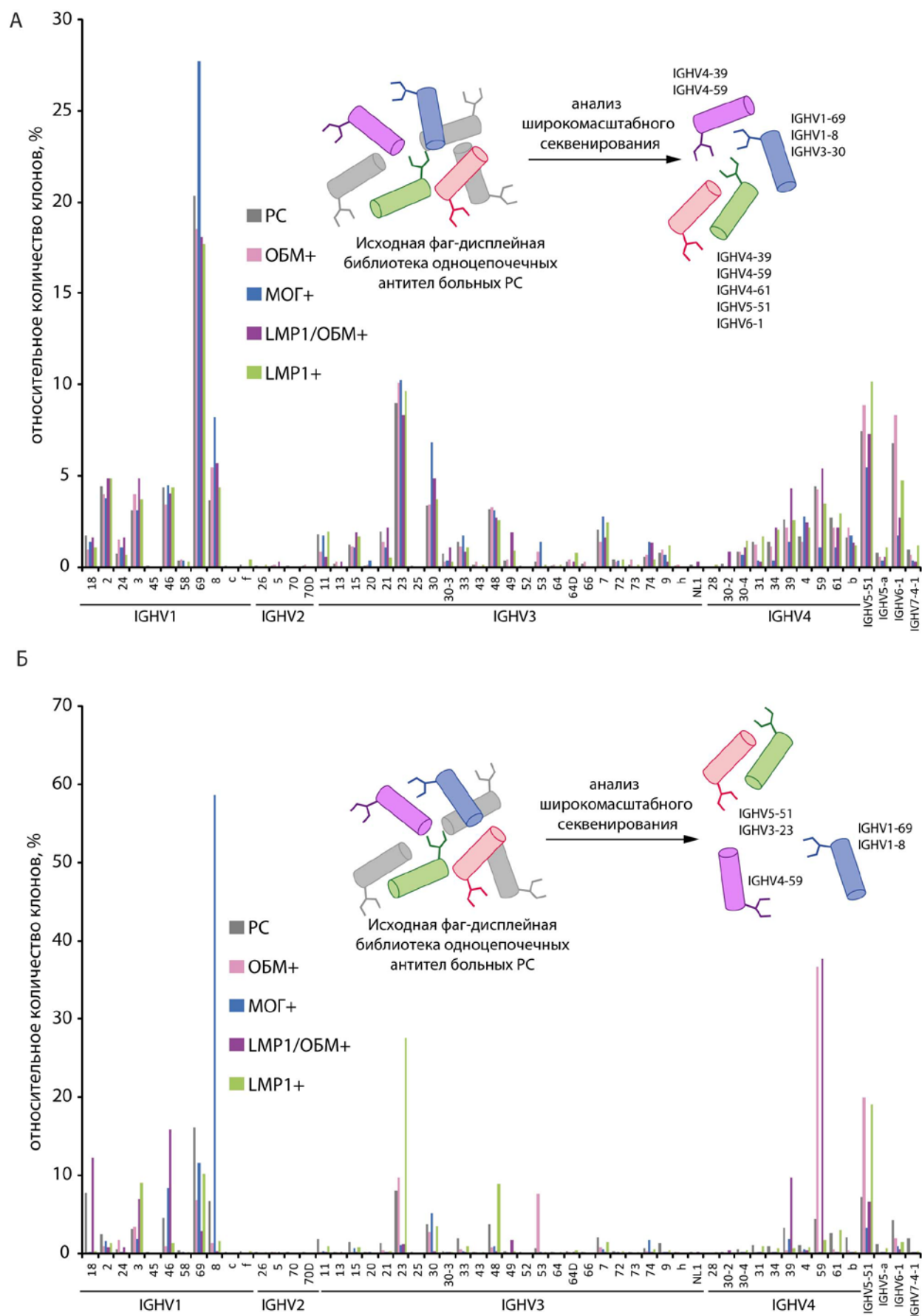


Таблица 7. Частота встречаемости функциональных генов IGHV, которые были обнаружены в РС фаг-дисплейной библиотеки и четырех обогащенных библиотеках в сравнении с литературными данными [219].

имя V-региона	РС	МОГ+	ОБМ+	LMP1-, ОБМ+	LMP1+	литературный диапазон
IGHV1-18	1.72	1.37	0.95	1.62	1.03	2.1–5.1
IGHV1-2	4.41	3.77	3.95	4.85	4.88	0.3–3.9
IGHV1-24	0.71	1.03	1.50	1.62	0.64	0.4–0.8
IGHV1-3	3.11	3.08	3.95	4.85	3.72	1.2–4.5
IGHV1-45	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.1–0.2
IGHV1-46	4.36	4.45	3.41	4.04	4.36	2.0–3.1
IGHV1-58	0.33	0.34	0.41	0.00	0.26	0.3–0.6
IGHV1-69	20.36	27.74	18.53	18.06	17.72	3.1–9.7
IGHV1-8	3.64	8.22	5.45	5.66	4.36	1.1–3.4
IGHV2-26	0.04	0.00	0.00	0.00	0.13	0.4–1.1
IGHV2-5	0.02	0.00	0.14	0.27	0.00	0.2–2.3
IGHV2-70	0.04	0.00	0.14	0.00	0.00	0.7–1.6
IGHV3-11	1.78	1.71	0.82	0.54	1.93	2.3–5.0
IGHV3-13	0.15	0.00	0.27	0.27	0.00	0.01–0.04
IGHV3-15	1.23	1.03	1.09	1.89	1.67	1.2–3.4
IGHV3-20	0.02	0.34	0.14	0.00	0.00	0.1–1.5
IGHV3-21	1.96	1.03	1.36	2.16	0.51	3.5–6.3
IGHV3-23	8.97	10.27	10.08	8.36	9.63	6.0–13.7
IGHV3-30	3.37	6.85	3.41	4.85	3.72	1.6–10.5
IGHV3-30-3	0.75	0.34	0.27	1.08	0.26	2.6–6.8
IGHV3-33	1.39	1.71	1.09	0.81	1.03	3.0–7.8
IGHV3-43	0.1	0.00	0.27	0.00	0.13	0.04–1.0
IGHV3-48	3.17	3.08	3.27	2.70	2.57	1.7–5.5
IGHV3-49	0.35	0.00	0.41	1.89	0.90	0.8–1.3
IGHV3-53	0.31	1.37	0.82	0.00	0.13	0.5–2.6
IGHV3-64	0.35	0.00	0.54	0.27	0.90	0.1–1.1
IGHV3-66	0.20	0.00	0.27	0.00	0.00	0.3–1.7
IGHV3-7	2.07	2.74	1.36	1.62	2.44	2.4–5.1
IGHV3-72	0.37	0.34	0.27	0.00	0.39	0.1–0.4
IGHV3-73	0.13	0.00	0.41	0.00	0.13	0.3–0.7
IGHV3-74	0.57	1.37	0.68	1.35	0.39	1.3–2.4
IGHV3-9	0.77	0.68	0.95	0.27	1.16	1.1–3.9
IGHV4-28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.01–0.07
IGHV4-30-2	0.18	0.00	0.00	0.81	0.00	0.05–1.2
IGHV4-30-4	0.86	0.68	0.82	1.08	1.41	0.03–1.5
IGHV4-31	1.37	0.34	1.23	0.27	1.67	0.8–4.1
IGHV4-34	1.39	0.34	1.09	2.16	2.05	2.7–9.7
IGHV4-39	2.62	1.37	2.18	4.31	2.57	2.0–8.0
IGHV4-4	1.65	2.74	1.36	2.43	2.18	0.4–2.6
IGHV4-59	4.41	1.03	4.22	5.39	3.47	3.1–7.6
IGHV4-61	2.71	1.03	2.18	2.16	2.95	0.6–2.1
IGHV5-51	7.45	5.48	8.86	7.28	10.14	0.5–3.0
IGHV5-a	0.79	0.34	0.54	0.54	1.03	0.04–2.5
IGHV6-1	6.79	1.71	8.31	2.70	4.75	0.5–1.1
IGHV3-NL1	0.13	0.00	0.00	0.27	0.00	nd
IGHV4-b	1.59	1.71	2.18	1.35	1.16	nd
IGHV7-4-1	0.97	0.34	0.68	0.27	1.16	nd

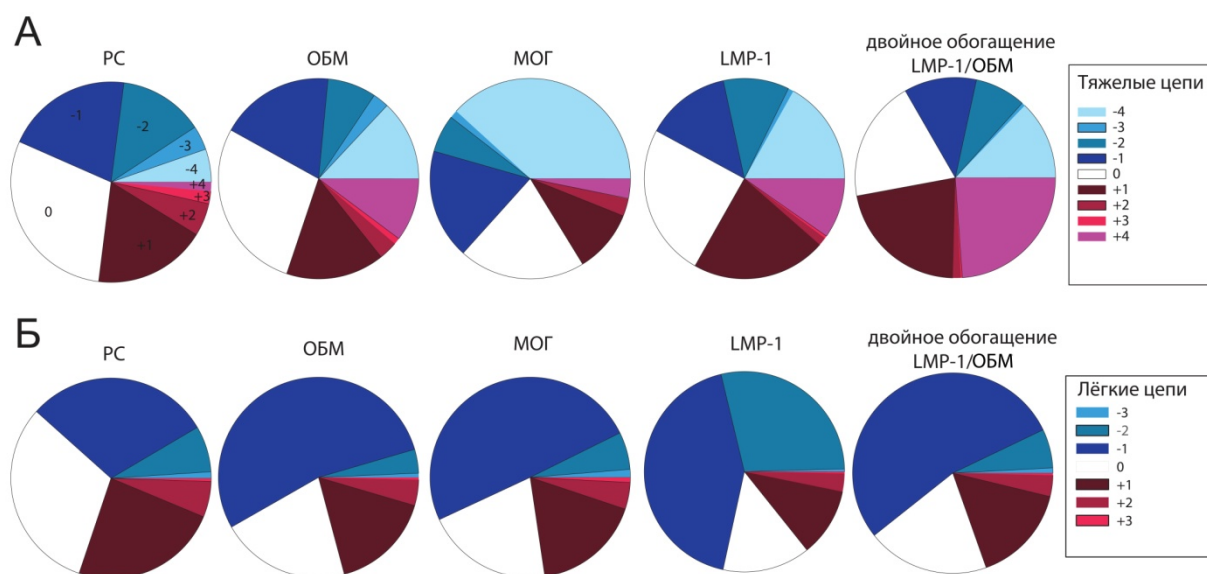
что в случае ОБМ и LMP1 спектр зародышевых семейств для  $V_H$  примерно совпадает с распределением начальной библиотеки РС, особенно для сегментов  $VH4$  (**рис.31 А**). В случае антител к МОГ видно, что наиболее распространены зародышевые семейства  $V_H$  IGHV1-69, IGHV1-8 и IGHV3-30. Необходимо заметить, что IGHV4-39 и IGHV4-59 преобладают в библиотеке LMP-1/ОБМ. Сравнительный количественный анализ показал, что клоны, амплифицированные на МОГ, в основном представлены IGHV1-8 и IGHV1-69 сегментами, а клоны, амплифицированные на ОБМ и LMP-1 в основном относятся к IGHV4-59, IGHV5-51, IGHV3-23 и IGHV4-59 сегментам.

Взаимодействие двух белков во многом обусловлено наличием заряда в области их соприкосновения. Так как у антитела наибольшую роль в формировании сайта связывания играет CDR3, мы решили оценить вклад электростатических взаимодействий данного региона в специфичность связывания при отборе на разные антигены, а также в отборе кроссреактивных клонов. С этой целью мы определили частоту встречаемости CDR3 с разными зарядами для тяжелых и легких цепей (**рис.32**), учитывая количество прочтений для каждой последовательности. Можно отметить, что в библиотеке, обогащенной на МОГ, практически на треть уменьшилось количество нейтрально заряженных CDR3 тяжелых цепей и в 7 раз увеличилось количество CDR3 с суммарным высоким отрицательным зарядом (-4 и больше) во многом за счет сокращения положительного заряда (+1). В отборе на остальные антигены наблюдается смещение суммарного заряда в высокозаряженные области как положительные (+4), так и отрицательные (-4). Для легких цепей, в основном, наблюдается уменьшение количества нейтрально заряженных и увеличение слабоотрицательных CDR3 (-1 – у ОБМ, МОГ, двойного обогащения LMP-1/ОБМ и -1-2 у LMP-1). Из этих данных можно сделать вывод, что хотя изначально в библиотеке антител больных РС (РС на **рис.32**), в некоторой степени отражающей распределение антител в организме больного, преобладают и иммуноглобулины с нейтральными CDR3, тенденцию к проявлению аутореактивности в основном имеют антитела с заряженными остатками в антигенсвязывающих центрах.



**Рисунок 31. Распределение частоты встречаемости IGHV сегментов в обогащенных библиотеках. (А) уникальные и (Б) raw данные. Специфические зародышевые семейства, для которых наблюдается тенденция к взаимодействию с определенными антигенами, выделены в каждом случае.**

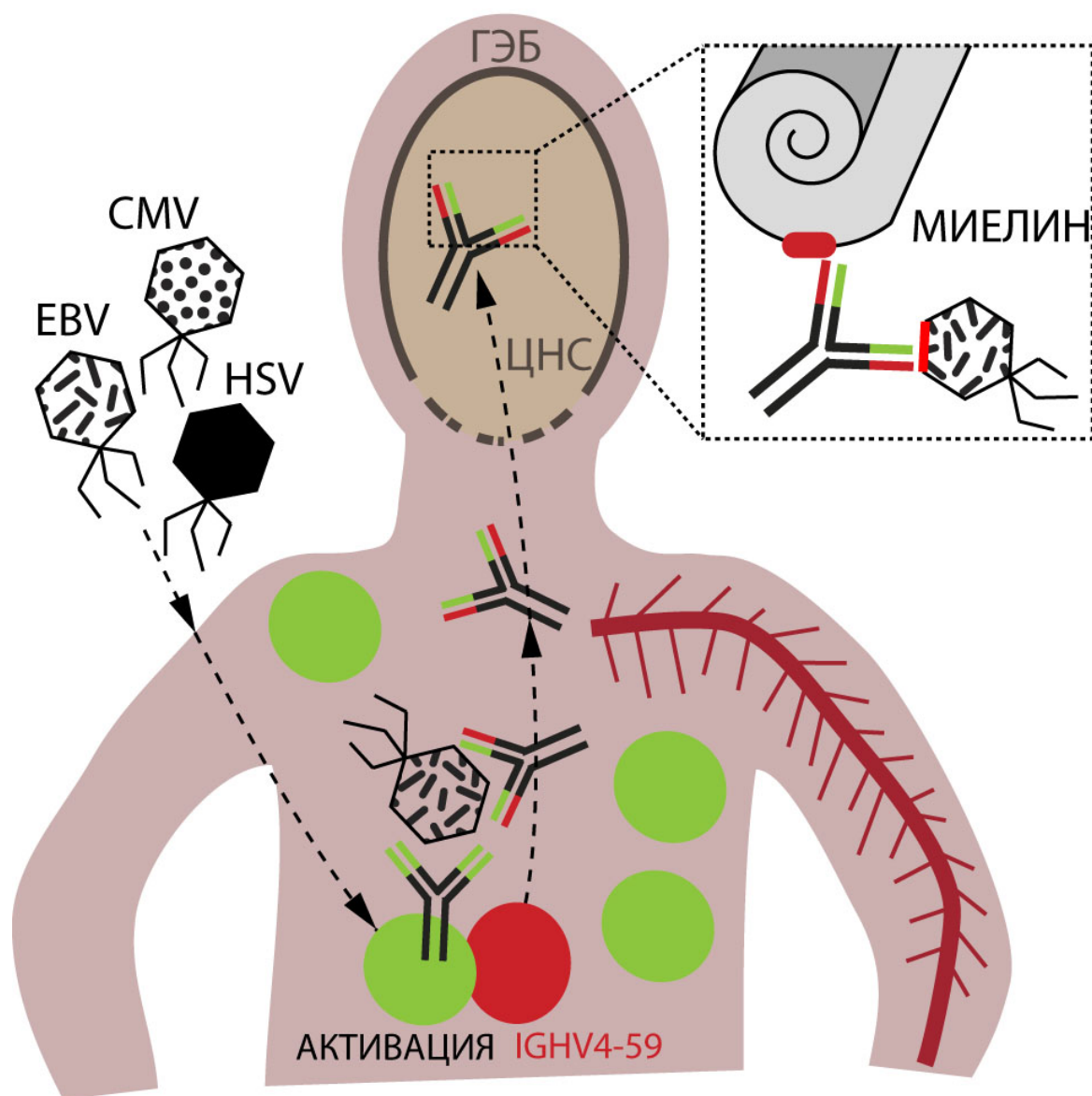
Причем у тяжелых цепей по сравнению с легкими наблюдается большее смещение заряда в крайние области по модулю – как в положительную, так и в отрицательную стороны. Это может свидетельствовать о более активном участии тяжелой цепи в формировании сайта связывания.



**Рисунок 32. Распределение суммарного заряда CDR3 в библиотеках, обогащенных на разные антигены для тяжелых (А) и легких (Б) цепей.**

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В итоге на основании результатов нашей работы и анализе литературных данных мы можем представить одну из возможных концепций развития РС следующим образом (**Рис.33**).



**Рисунок 33. Предлагаемая концепция триггерной роли вирусов в развитии РС**

На наш взгляд, высокая гомология антител, способных связывать ОБМ, с противовирусными антителами потенциально указывает на то, что первичной мишенью для подобных антител может служить ряд вирусных белков. Необходимо отметить, что наряду с потенциально патогенными кроссреактивными клетками активируются и нормальные клетки иммунной системы, направленные только на элиминацию вируса. Таким образом, далеко

не все клетки, активированные вирусом, при попадании в ЦНС могут инициировать разрушение миелиновой оболочки. В результате работы нами определены гены зародышевой линии, для которой характерна продукция именно патогенных кроссреактивных антител. На наш взгляд, для возникновения РС и активации патогенных В-клеток, наряду с генетическими и экологическими факторами, необходимо наличие не какого-либо определенного экзогенного патогена, а его способность, проникая в ЦНС, увлекать за собой клетки иммунной системы, что в итоге приводит к их «множественной и беспорядочной» активации.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Работа с нуклеиновыми кислотами**

#### ***Аmplификация фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции***

Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе PTC-200 M&J Research, США. Для амплификации фрагментов с помощью Taq-полимеразы или полимеразы Pfu использовали стандартные протоколы, рекомендованные производителем фермента.

Расчет температуры отжига праймера (X) производили по формуле:

$$X = 2^{\circ}\text{C} \times n (\text{A/T}) + 4^{\circ}\text{C} \times n (\text{G/C}) - 5^{\circ}\text{C},$$

где n - число соответствующих нуклеотидов. Для праймеров длиной более 25 нуклеотидов использовали температуру отжига 65°C или максимальную возможную температуру, определенную экспериментально.

#### ***Рестрикция***

Рестриксию проводили в соответствии с методиками производителей ферментов. Рестриксию ПЦР продуктов вели 14-16 часов, плазмидной ДНК – 1-2 часа. При рестрикции плазмидной ДНК, в последние 10 минут инкубации добавляли панкреатическую рибонуклеазу до конечной концентрации 1 мкг/мл.

#### ***Лигирование***

Для лигирования использовали ДНК-лигазу фага T4 и стандартный буферный раствор (Fermentas, Литва) или Rapid Ligation Kit (Fermentas, Литва). Лигирование вели в объеме 10 или 20 мкл, при молярном соотношении вектора и вставки 1:10. Затем в лигазную смесь добавляли 1/10 объема тРНК или 0,5-1 мкл Pellet (Novagen) (соосадителя), обрабатывали равным объемом хлороформа, и переосаждали водную фазу тремя объемами этанола. Центрифугировали 10 минут на скорости 13200 об/мин при

комнатной температуре, промывали осадок ледяным 70% этанолом (-20°C) и растворяли в 6 мкл воды. Для трансформации использовали 3 мкл лигата.

### ***Выделение плазмидной ДНК***

Выделение плазмидной ДНК в большинстве случаев проводили по [220] с некоторыми модификациями.

Одну колонию бактерий инкубировали в 5 мл LB или 2xYT с добавлением селективного антибиотика и растили при 37°C с хорошей аэрацией в течение 18-22 часов. Осаждали клетки центрифугированием 3 минуты на скорости 5000 об/мин при комнатной температуре последовательно в один эппендорф. Ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера (50 mM глюкоза, 25 mM Трис-HCl pH 8.0; 10 mM ЭДТА), инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Добавляли 400 мкл свежеприготовленного раствора 0.2 M NaOH, 1% ДСН, перемешивали переворачиванием и инкубировали на льду 5 минут. Затем быстро нейтрализовали 300 мкл ледяного 7.5 M NH<sub>4</sub>Ac pH 7.6, перемешивали переворачиванием и 10 минут инкубировали при комнатной температуре до образования белого осадка, который осаждали центрифугированием на скорости 12500 об/мин при комнатной температуре в течение 5 минут. Супернатант переносили в новую микроцентрифужную пробирку с 0.6 объема (540 мкл) изопропанола, перемешивали переворачиванием до образования взвешенного белого осадка, 10 минут центрифугировали на скорости 12500 об/мин при комнатной температуре. Осадок суспендировали в 100 мкл ледяного 2 M NH<sub>4</sub>Ac pH 7.4 на льду и инкубировали в течение 5 минут при 0°C. Затем центрифугировали 5 минут в тех же условиях, супернатант переносили в пробирку с 100 мкл изопропанола. 10 минут инкубировали при комнатной температуре, центрифугировали 10 минут в тех же условиях. Осадок промывали 300 мкл соленого спирта, подсушивали на воздухе, растворяли в 20 мкл TE или воды.

Выделение плазмидной ДНК для секвенирования проводили согласно приведенной выше методике со следующими модификациями:



Осадок, полученный после второго переосаждения изопропанолом, повторно суспендировали в 100 мкл ледяного 2 М  $\text{NH}_4\text{Ac}$  pH 7.0, инкубировали 5 минут при 0°C центрифугировали 5 минут на скорости 12500 об/мин при комнатной температуре, супернатант переосаждали изопропанолом, как описано выше.

Осадок, полученный после третьего переосаждения изопропанолом растворяли в 49 мкл TE, добавляли 1 мкг/мл панкреатической РНКазы, инкубировали 15 минут при 37°C. Добавляли 25 мкл 2 М  $\text{NH}_4\text{Ac}$  pH 7.4 и 75 мкл изопропанола, инкубировали 10 минут при комнатной температуре, центрифугировали на скорости 12500 об/мин при комнатной температуре. Осадок трижды промывали 300 мкл соленого спирта, подсушивали на воздухе, растворяли в 20 мкл TE или воды.

### ***Электрофорез ДНК в агарозном геле***

Для проведения электрофореза использовали 0,8-1,5% агарозный гель, приготовленный на однократном TBE с бромистым этидием в концентрации 0.5 мкг/мл. По окончании электрофореза ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм на трансиллюминаторе фирмы LKB или Versadoc фирмы Bio-Rad.

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

Для проведения электрофореза использовали 5% полиакриламидный гель, (соотношение акриламида и бисакриламида 19:1), приготовленный на однократном TBE. Толщина аналитического геля составляла 0.75 мм, препаративного – 1.0 мм. Процесс осуществляли на приборе EC-200 фирмы EC Apparatus (США). В течение 30 минут проводили предварительный форез при 90-110 В. Пробы смешивали в соотношении 1:10 с буфером нанесения, содержащим 0.1% бромфенолового синего, 0.5% ДСН, 0.1 М ЭДТА, pH 8.0, 50% глицерина и наносили на гель. Начинали электрофорез при 100 В до вхождения проб в гель, после этого поднимали напряжение до 130-140 В. По

окончании электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (1 мкг/мл) и визуализировали в ультрафиолетовом свете.

### ***Электроэлюция***

Фрагменты ДНК элюировали из однопроцентных агарозных или пятипроцентных полиакриламидных гелей. После завершения электрофореза, гель окрашивали в растворе бромистого этидия (1 мкг/мл) и визуализировали в ультрафиолетовом свете, далее вырезали нужный фрагмент геля, помещали его в диализный мешок с 50-80 мкл однократного ТВЕ. Затем осуществляли электроэлюцию в форезной камере Hoefer Scientific Instruments при 100В в ТВЕ около 20 минут. Перемещение ДНК из геля в раствор контролировали в ультрафиолетовом свете.

К элюату ДНК добавляли раствор NaCl до 0.14 М, обрабатывали смесью фенол-хлороформ 1:1, перемешивали, центрифугировали 5 мин на скорости 8000 об/мин при комнатной температуре. Водную фазу осаждали 3 объемами этанола, центрифугировали 10 мин на скорости 13200 об/мин при комнатной температуре, осадок промывали соленым спиртом, высушивали, растворяли в ТЕ или воде.

### ***Секвенирование плазмидной ДНК***

Секвенирование плазмидной ДНК проводили при помощи автоматического секвенатора ABI PRISM.

### ***Широкомасштабное секвенирование генов переменных участков V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> из фаг-дисплейных библиотек***

Начальная фаг-дисплейная библиотека РС и 4 под-библиотеки, обогащенные на разные антигены (ОБМ, МОГ, LMP1, двойное обогащение LMP1/ОБМ) были амплифицированы в клетках TG-1 *E. Coli*. ПЦР была поставлена с использованием Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Fermentas). Реакционная смесь содержала 5 нг плазмиды ДНК в качестве матрицы и 10 pmol фланкирующих праймеров (21-24 для V<sub>H</sub> и 25-26 для V<sub>L</sub> из приложения). ПЦР-продукты были очищены с помощью набора GeneJET Gel

Extraction Kit (Thermo Scientific, USA) и лигированы с адаптарами NEBNext Multiplex Oligos (New England Biolabs, UK), используя NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, UK). После приготовления образцов, библиотеки были проанализированы с помощью Qubit (Invitrogen) - количественно и 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) - качественно. На основе обчетов библиотеки были нормализованы до концентрации 10 nM и смешаны в эквимольном соотношении. Амплификация образцов была проведена в соответствии с протоколом (Illumina) с использованием MiSeq с Reagent Kit v2 (2x250). Объединение и приведение в соответствие друг с другом связанных прочтений было сделано на базе GW CLC Bio. Непосредственно идентификация характеристик антител после широкомасштабного секвенирования была проведена с использованием онлайн ресурса IMGT/HighV-QUEST [221].

### ***Параметры фильтров для анализа встречаемости гипервариабельных участков***

Результаты выравниваний последовательностей, полученных методом широкомасштабного секвенирования, после анализа с помощью программы IMGT/V-QUEST [217] были отфильтрованы по следующим критериям: поле "Functionality" выравнивания должно быть "productive" (конкретная последовательность антитела должна быть оценена программой как продуктивная); идентичность аллели V-гена с аллелью зародышевого сегмента из базы IMGT должна быть не меньше 70%; для последовательностей легких цепей не брались в расчет те, что были идентифицированы программой IMGT/V-QUEST как тяжелые цепи.

### ***Создание генетических конструкций для экспрессии рекомбинантных одноцепочечных антител***

На базе вектора pET22-N (Invitrogen) была создана конструкция с тегом 3xFlag (вставка проходила по сайтам XhoI/SalI), получившая название pET22N/Flag. Далее пцр-продукты, соответствующие переменным

фрагментам отобранных одноцепочечных антител, были переклонированы в вектор pET22N/Flag по сайтам рестрикции NcoI/NotI.

***Создание генетических конструкций для экспрессии рекомбинантных полноразмерных антител.***

Экспрессионный вектор для тяжелой цепи был получен на основе вектора pBudCE4.1 (Invitrogen) путем удаления последовательности EF промотера, используя рестрикцию по сайтам NheI/XhoI и дальнейшее «тупое» лигирование (получен вектор pBudCE4.1/CMV). Нуклеотидная последовательность, кодирующая лидерный пептид тяжелой цепи IgG (MERHWIFLSLLSVIAGVHS), была вставлена в вектор pBudCE4.1/CMV по сайтам рестрикции HindIII/PstI (получен вектор pBudCE4.1/CMV/LeadH). Далее два фрагмента ДНК, соответствующие константному региону C $\gamma$ 1 человека были амплифицированы с помощью пцр с четырех специфических праймеров (1-4 из приложения), используя геномную ДНК человека в качестве матрицы. Полученные фрагменты были последовательно вставлены в вектор pBudCE4.1/CMV/LeadH. Последовательности переменных фрагментов тяжелых цепей отобранных антител амплифицировались с векторов pET22N/Flag/scFv, где scFv соответствует определенному отобранному одноцепочечному антителу, и переставлялись в экспрессионный вектор pBudCE4.1/CMV/LeadH/ $\gamma$  по сайтам рестрикции Acc65I(Bsp1407I) и XhoI с предварительным проведением пцр с соответствующими специфическими праймерами (5-9 из приложения).

Экспрессионный вектор для легкой цепи (pBudCE 4.1/EF/LeadL/ $\lambda$ -2) был получен на основе вектора pBudCE4.1 (Invitrogen) путем удаления последовательности CMV промотера, используя рестрикцию по сайтам SpeI/XbaI и дальнейшее «тупое» лигирование (получен вектор pBudCE4.1/EF). Нуклеотидная последовательность, кодирующая лидерный пептид легкой цепи Ig (MVSTPQFLVLLFWIPASRG), была вставлена в вектор pBudCE4.1/EF по сайтам рестрикции NotI/KpnI (получен вектор pBudCE4.1/EF/LeadL). ДНК линкеру с фланкирующими сайтами рестрикции,

соответствующими части лидера лёгкой цепи и началу j-фрагмента (олигонуклеотид 10 из приложения) был получен из четырех перекрывающихся олигонуклеотидов. Полученный продукт был вставлен в pBudCE4.1/EF/LeadL по сайтам рестрикции BglII/XbaI (получен вектор pBudCE4.1/EF/LeadL/Linker). Далее два фрагмента ДНК, соответствующие константному региону C $\lambda$ -2 человека были амплифицированы с помощью пцр с четырех специфических праймеров (11-14 из приложения), используя геномную ДНК человека в качестве матрицы. Полученные фрагменты были последовательно вставлены в вектор pBudCE4.1/EF/LeadL/Linker. Последовательности переменных фрагментов лёгких цепей отобранных антител амплифицировались с векторов pET22N/Flag/scFv, где scFv соответствует определенному отобранному одноцепочечному антителу, и переставлялись в экспрессионный вектор pBudCE4.1/EF/LeadL/ $\lambda$ -2 по сайтам рестрикции XbaI/HindIII с предварительным проведением пцр с соответствующими специфическими праймерами (15-20 из приложения).

## **РАБОТА С БЕЛКАМИ.**

### *Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле.*

Электрофорез проводили по стандартной методике Лэммли [222] при концентрации смеси акриламид-бисакриламид в разделяющем геле 5, 7, 10 или 14% в зависимости от необходимого диапазона масс разделяемых белков. Двухкратный буфер нанесения: 5% 2-меркаптоэтанола, 4% ДСН, 0.25 М Трис-НСl, рН 6.8; 4 мМ ЭДТА-Na, рН 8.0, 10% глицерина, 0.25 мг/мл бромфенолового синего. Пятикратный электродный буфер: глицин 72 г/л, ДСН 5 г/л, Трис-НСl 6.5 г/л, рН 8.3.

Образцы белковых препаратов смешивали с буфером нанесения в соотношении 1:1, прогревали 5 минут при 98°C, наносили на гель и вели электрофорез при напряжении 90 В до перемещения красителя в разделяющий гель, после чего выставляли силу тока 25 мА на 1 пластину геля и вели электрофорез до момента выхода краски из разделяющего геля.

Трициновый электрофорез проводился по стандартной методике [223], с 16.5%Т 0.6%С разделяющим гелем.

### ***Окрашивание ПААГ.***

Окрашивание геля Кумасси синим R-250 с усилением контраста солью меди проводили по [224]. Разделяющий гель 5 минут инкубировали в горячем растворе, содержащем 10% этанола и 10% уксусной кислоты. Далее его помещали на 10 минут в горячий раствор следующего состава: 15% этанола, 25% уксусной кислоты, 0.3 г/л красителя Кумасси синий R-250 и 0.45 г/л пятиводного сульфата меди. Затем гель многократно отмывали в горячем растворе, содержащем 10% этилового спирта и 10% уксусной кислоты до полного исчезновения фонового окрашивания.

Окрашивание геля серебром проводили набором PageSilver™ Silver Staining Kit (Fermentas).

Денситометрию пластин геля и окрашенных мембран проводили при помощи компьютерного сканера и программы TotalLab v2.01. (Nonlinear Dynamics, ltd., США).

### ***Иммуноблоттинг.***

Проводили гель-электрофорез белков в денатурирующих условиях по Лэммли с использованием предокрашенного маркера (Fermentas, Литва).

Отделяли разделяющий гель и проводили перенос на мембрану HyBond C extra (Amersham, США) на приборе для полусухого электропереноса 2117 MULTIPHOR II Electrophoresis Unit производства LKB (Швеция) согласно инструкции производителя. Для этого вырезали мембрану, 3 листа бумаги Whatman 3MM размером с гель и 3 листа ватмана на 1 см больше с каждого края, смачивали все в буфере для переноса, содержащем 39 мМ глицин, 48 мМ Трис-основание, 0.0375% ДСН и 20% этиловый спирт. Помещали на нижний электрод установки для переноса стопку бумаги Whatman 3MM (листы большего размера), сверху мембрану, затем гель, стопку бумаги Whatman 3MM, накрывали верхним электродом и вели электроперенос в

течение 1 часа при силе тока 0.8 мА/см<sup>2</sup>. По окончании процесса мембрану помещали в блокирующий раствор, содержащий 5% БСА или молока в PBS, на качающейся платформе. Инкубацию вели 1 час при +37С или в течение 12-14 часов при +4С. Далее мембрану отмывали 3 раза по 5 минут в PBS, содержащем 0.05% Tween 20.

Гибридизацию со специфическими антителами в разведении 1:500 – 1:20000 проводили в течение часа в PBS, 0.5% БСА, после чего опять трижды отмывали. Затем мембрану (в случае необходимости) час инкубировали со вторичными специфическими антителами (1:4000 – 1:10000), конъюгированными с пероксидазой хрена, и отмывали 5 раз по 5 минут и проявляли при помощи ECL-Developing Kit или ECL-Plus Kit.

### ***Иммуноферментный анализ.***

Иммуноферментный анализ проводили по схеме sandwich ELISA. На первом этапе в лунки помещали 50 мкл раствора смеси 100 мМ карбоната и гидрокарбоната натрия рН 9.0, содержащего 0.25 мкг антител козы, специфичных к полноразмерной молекуле IgG мыши или человека, или соответствующего антигена и инкубировали 14 часов при +4°С. Лунки 3 раза промывали раствором PBS-Tween 0.15%, блокировали 1 час раствором 2% БСА в карбонатном буфере при +37°С. Далее блокирующий раствор удаляли, лунки 3 раза промывали раствором PBS-Tween 0.15%. Вносили разведения изучаемых антител и контрольных образцов в диапазоне от 1 до 0.0005 мкг в 50 мкл раствора PBS-0.5% БСА, инкубировали 1 час при +37°С, после чего снова трижды промывали. Затем добавляли по 50 мкл конъюгата антител козы, специфичных к Fc-фрагменту или к легкой (каппа или лямбда) цепи IgG мыши или человека. Инкубировали час при +37°С, промывали пять раз. Окрашивание проводили, добавляя во все лунки по 50 мкл раствора тетраметилбензидина. Реакцию останавливали 10% раствором фосфорной кислоты и измеряли абсорбцию при длине волны 450 нм на планшетном спектрофотометре (Tecan, Genios, Австрия).

## **ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОЦЕДУРЫ.**

### ***Выделение и очистка рекомбинантных антител***

Выделение рекомбинантных моноклональных человеческих антител класса IgG проводили с применением следующей методики. Глобулиновую фракцию изначально получали трехкратным высаливанием сульфатом аммония при 50% насыщения или методом ультрафильтрации на приборе Pellicon (Millipore). Дальнейшую очистку IgG антител осуществляли на аффинной колонке HiTrap Protein-G Sepahrose (GE Healthcare) в буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl, 50 мМ NaCl, pH 7.6. Колонку промывали до прекращения дрейфа базовой линии, но не менее чем 100 объемами буфер нанесения. Антитела элюировали 100 мМ раствором глицин-HCl pH 2.5 и немедленно нейтрализовали 2 М раствором трис основания до pH 7.6. Все растворы для хроматографической очистки перед использованием стерилизовали автоклавированием. Непосредственно перед использованием колонку очищали 15 объемами 100 мМ раствора глицина-HCl pH 2.5 и 2М LiCl. Заключительным этапом очистки являлась гель-фильтрация на колонке Superdex 200 в буфере PBS на скорости 0.8 мл/мин. Отсутствие видимых белковых примесей в очищенных препаратах антител контролировали ДСН-ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси синим.

### ***Очистка рекомбинантных одноцепочечных антител (scFv)***

Ночную культуру клеток, трансформированных необходимой генетической конструкцией, высевали в среду 2xYT в разведении 1:100, подращивали до достижения оптической плотности  $A_{600}=0.6$  единиц на 37 °C (1 ч. 40 мин. - 2 ч.). Индуцировали добавлением IPTG до 0.1 мМ. Растили культуру при +30 °C в течении 6 часов. Клетки из 250 мл среды, осаждали центрифугированием 5 минут на скорости 5000 об/мин при 4 °C. Ресуспендировали примерно в 1/20 исходного объема (12-15 мл) буфера, содержащего 20 мМ Трис-HCl, pH 8.0. Добавляли 1/50 объема свежеприготовленного раствора лизоцима до концентрации 0.2 мг/мл,



держали на льду 25-30 мин. Затем добавляли 1/100 объема 10% раствора Triton X100, инкубировали, помешивая, 10 минут при 37°C. Добавляли раствор ДНКазы I до концентрации 5 мкг/мл и MgCl<sub>2</sub> до 8 мМ инкубировали 10 минут при 37°C (до полного исчезновения вязкости). Центрифугировали на скорости 10000 об/мин 10-20 минут при 4°C. Супернатант наносили на предварительно уравновешенный буфером металлхелатный сорбент Talon Superflow (BD, США) на скорости 0.5 мл/мин. Затем колонку промывали 100 объемами раствора, содержащего 50 мМ фосфата натрия, 300 мМ NaCl, pH 7.0. Элюцию рекомбинантного белка проводили 150 мМ раствором имидазола в 50 мМ фосфатном буфере pH 8.0 на скорости 0.5 мл/мин. Образец после металлхелатной хроматографии диализовали против 10 мМ Tris-HCl pH 8.0. Дальнейшую очистку проводили на аффинной смоле a-Flag agarose с элюцией белков раствором глицина-HCl pH 2.5. Скорость потока составляла 0.8 мл/мин. Заключительным этапом очистки являлась гель-фильтрация на колонке Superdex 75 (GE Healthcare) в буфере ФСБ на скорости 0.8 мл/мин.

#### ***Выделение и очистка рекомбинантных фьюжен-белков trx-обм пептидов***

Ночную культуру клеток, трансформированных необходимой генетической конструкцией, высевали в среду 2xYT в разведении 1:100, подращивали до достижения оптической плотности 0.6 - 0.8 единиц на +37°C (2-3 часа). Индуцировали 2.5-3 часа добавлением 1 мМ IPTG на +30°C. Клетки из 250 мл среды, осаждали центрифугированием 5 минут на скорости 5000 об/мин при +4°C. Ресуспендировали примерно в 1/20 исходного объема (12-15 мл) буфера, содержащего 20 мМ Трис-HCl, pH 8.0 и 1 мМ ЭДТА, pH 8.0. Добавляли к суспензии коктейль ингибиторов протеаз (до 1 мМ) и 1/50 объема свежеприготовленного раствора лизоцима до концентрации 0.2 мг/мл, держали на льду 25-30 мин. Затем добавляли 1/100 объема 10% раствора Triton X-100, инкубировали, помешивая, 10 минут при 37°C. Лизат на льду обрабатывали ультразвуком до исчезновения вязкости. Центрифугировали на скорости 10000 об/мин 10-20 минут при +4°C. Супернатант отбирали в чистую пробирку, добавляли равный объем насыщенного раствора сульфата аммония

и оставляли на 12-14 часов на +4°C. Далее суспензию осаждали на скорости 10000 об/мин 15 минут при +4°C, растворяли в 12-15 мл хроматографического буфера, содержащем 50 мМ фосфата натрия, 300 мМ NaCl, pH 8.0 и еще раз центрифугировали 15 минут на скорости 10000 об/мин. Супернатант наносили на предварительно уравновешенный буфером металлхелатный сорбент Talon Superflow (BD, США) на скорости 1 мл/мин. Затем колонку промывали 100-120 объемами раствора, содержащего 50 мМ фосфата натрия, 300 мМ NaCl, pH 7.0. Элюцию рекомбинантного белка проводили 50 мМ раствором ЭДТА на скорости 0.5 мл/мин. Заключительным этапом очистки являлась гель-фильтрация на колонке Superdex 75 (GE Healthcare) в растворе гидрокарбоната аммония на скорости 0.8 мл/мин. Полученный раствор белка был разнесен на аликвоты и лиофилизирован. Рекомбинантный внеклеточный домен МОГ был получен согласно [42]. Остальные белки, экспрессированные в клетках штамма BL21(DE3), выделяли как тельца включения, согласно [224], солюбилизировали 8 М раствором мочевины и проводили металлхелатную хроматографию по методикам производителя сорбента. Очищенные целевые белки диализовали против воды или ФСБ.

### ***Обращенно-фазовая хроматография***

Обращенно-фазовую хроматографию проводили с использованием аналитической колонки C<sub>4</sub> 4.0/150 (Dr. Maisch GmbH, Германия) и препаративной колонки C<sub>4</sub> 10/250 (Mashery-Nagel, Германия) на HPLC-хроматографе Waters 1525 (Millipore, США) в градиенте ацетонитрила 0-40% или 0-80% в 15 объемах колонки. Во всех растворах присутствовала 0.1% трифторуксусная кислота в качестве ион-парного агента.

### ***Молекулярное моделирование***

3D модели рекомбинантных одноцепочечных антител создавали, используя Swiss PDB Viewer 3.7 и Swiss Model сервер, в соответствии с инструкцией разработчиков ПО. VH и VL цепи моделировали по отдельности используя опцию First Approach на сервере Swiss Model. Четвертичную

структуру антител моделировали в программе Swiss PDB Viewer 3.7, используя известную структуру антитела (1Q1J в Protein Data Bank) в качестве матрицы.

### ***Метод поверхностного плазмонного резонанса***

Измерения поверхностного плазмонного резонанса проводили на приборе Biacore T200 optical biosensor (GE Healthcare). Все процедуры выполнялись при 20°C с использованием стандартных чипов для иммобилизации CM5 sensor chips и фирменного буфера HBS (pH 7.4, 0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.05% сурфактанта P-20). ОБМ иммобилизовали на чипе (до достижения относительного сигнала иммобилизации ~3500 RU) с использованием амино-сшивающего кита, следуя рекомендациям производителя. Очищенные антитела добавляли в качестве аналита при различных концентрациях. Поверхность чипов регенирировали между различными аналитами промывкой 10 mM Глициновым буфером, pH 2.5. Диаграммы ППР анализировали для определения динамических констант диссоциации ( $K_D$ ,  $k_a$ ,  $k_d$ ), применяя кинетическую модель связывания Langmuir 1:1 (одна молекула аналита взаимодействует с одной молекулой лиганда).

### ***Анализ кроссреактивности антител с использованием технологии Lumiplex***

Все измерения производились с помощью системы BioPlex MAGPIX (Bio-Rad). Антигены ковалентно иммобилизовали на магнитные микросферы BioPlex Pro Magnetic COOH Beads с использованием амин-сшивающего кита Bio-Rad amine coupling kit, следуя рекомендациям производителя. Исследуемые антитела инкубировали с антигенами, иммобилизованными на микросферах в течение 1 ч. при 20°C с постоянным деликатным помешиванием. Связавшиеся антитела детектировали с помощью антител козы к человеческим IgG (специфичные к  $\gamma$ -цепи), конъюгированных с R-фикоэритрином (Sigma-Aldrich).

## **МЕТОДЫ РАБОТЫ С БАКТЕРИЯМИ *ESCHERICHIA COLI*.**

### ***Получение электрокомпетентных клеток***

Клетки из музея истощающим штрихом высевались на чашку Петри с LB-агаром без антибиотика, инкубировались 14 часов при 37°C в воздушном термостате.

Отдельную колонию инокулировали в 5 мл 2xYT без антибиотика для получения ночной культуры и растили при 37°C с хорошей аэрацией.

250 мкл и 750 мкл ночной культуры высевали с разбавлением 1:1000 и 1:333 соответственно в две 2-х литровые банки, содержащие по 250 мл среды SOB, и растили при 37°C с хорошей аэрацией до оптической плотности 0.4, но не более двух часов. Затем клетки охлаждали во льду около десяти минут, стерильно переносили в охлажденные центрифужные стаканы на 250 мл, центрифугировали 10 минут 4000 об/мин при 0°C на центрифуге Beckman J-21.

Суспендировали клетки в небольшом объеме ледяной стерильной деионизированной воды, переносили в стерильные охлажденные центрифужные стаканы на 35 мл, доливали водой до верху, центрифугировали в тех же условиях. Повторяли еще 2 раза промывку водой, затем промывали охлажденным 10% глицерином. Осадок суспендировали в 2-3 мл 10% глицерина, разносили по 100 мкл в стерильные охлажденные эппендорфы, после чего замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C.

Компетентность клеток проверялась трансформацией плазмидой с известной концентрацией и принималась равной количеству выросших колоний поделенной на количество плазмиды в мкг.

### ***Трансформация клеток *E.coli* методом электропорации***

Электропорация проводилась на приборе фирмы Genetronics согласно инструкции производителя. Использовались 1 мм кюветы фирмы BioRad.

К размороженной на льду аликвоте (100 мкл) электрокомпетентных клеток добавляли раствор плазмиды или очищенную и обессоленную

лигазную смесь, перемешивая, переносили клетки в охлажденную кювету и осуществляли электропорацию (1.2-1.4 V / 5.19-5.22 мс). Затем клетки переносили в 1 мл теплой среды SOC без антибиотиков, инкубировали в воздушном термостате при 37°C 1 час для репарации клеточной стенки и начала экспрессии генов устойчивости к селективным антибиотикам. Далее высевали (100 мкл при трансформации плазмидой, 0.5 мл при трансформации лигазной смесью) на чашку Петри с LB-агаром, с добавлением селективных антибиотиков, и помещали в воздушный термостат на 37°C на 14-16 часов.

### ***ПЦР с колоний***

Аmplификацию проводили на приборе DNA S1000 Thermal Cycler Bio-rad по следующей схеме.

Готовили инкубационную смесь следующего состава:

- 2.5 мкл десятикратного буфера для Taq-полимеразы
- по 10 пМ прямого и обратного праймера
- по 2 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата
- вода до 24 мкл

Раствор разносили по пробиркам по 25 мкл.

Бактериальные колонии переносили петлей в пробирки и одновременно делали штрихи на свежей, размеченной чашке Петри с твердой питательной средой. Пробирки помещали в прибор, проводили денатурацию при 94°C 3 минуты, на последней минуте первого цикла по пробиркам разносили Taq-полимеразу. Далее осуществляли 25 циклов ПЦР (денатурация: 94°C 30 сек, отжиг праймера  $X = 2^{\circ}\text{C} \times n (\text{A/T}) + 4^{\circ}\text{C} \times n (\text{G/C}) - 5^{\circ}\text{C}$  30 сек, элонгация 72°C 30-90 сек).

Продукты полимеразной цепной реакции анализировали электрофорезом в агарозном геле.

## ***Ночная культура***

Бактериальную колонию помещали в 5 мл среды LowSalt или 2xYT с добавлением селективного антибиотика, наращивали клетки при 37°C и интенсивной аэрации около 12-14 часов.

## ***Приготовление музейного штамма***

Из отдельной колонии бактерий выращивали ночную культуру, добавляли глицерин до концентрации 12-14%, инкубировали 20 минут при комнатной температуре, делили на аликвоты по 1 мл и замораживали их в жидком азоте. Далее хранение осуществляли при температуре -70°C.

Штамм из музея рассевали истощающим штрихом на чашку Петри, содержащую среду LB-агар и инкубировали 14-16 часов при 37°C в воздушном термостате.

## ***Экспрессия рекомбинантных белков МОГ, пептидов ОБМ в клетках E. Coli***

Для экспрессии белков в клетках штамма BL21(DE3) были использованы следующие условия: подрост в течение 2 часов при температуре 30°C с последующим добавлением индуктора (ИПТГ) до концентрации 0.1 - 1 мМ и дальнейшая инкубация в течение 2 - 8 часов при температуре 30 °С.

## **РАБОТА С ФАГАМИ**

### ***Аmplификация библиотеки***

Сток библиотеки в TG-1 клетках (2 мл) инокулировали в 500 мл 2xYT, содержащей 100мкг/мл ампициллина и 1% глюкозы. Клетки подращивали на 37°C до плотности  $A_{600}=0.5$ , после этого 25 мл культуры ( $\sim 1 \times 10^{10}$  бактериальных клеток), инфицировали фагами-помощниками M13K07 в соотношении бактериальных клеток к фагам-помощникам 1:20, инкубировали 30 мин при 37°C без качания. Клетки осаждали центрифугированием при 3000g в течение 10 мин, осадки ресуспендировали в 30 мл среды 2xYT,

содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл канамицина, разводили этой же средой до объема 500 мл и растили в течение 5 – 7 часов при интенсивной аэрации при 30<sup>0</sup>С.

Культуру центрифугировали при 10000g в течение 10 мин, к полученному супернатанту, содержащему бактериофаги, добавляли 1/5 объема ПЭГ/NaCl и оставляли во льду на 2 часа. Фаговую суспензию осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 30 мин. Осажденный фаговый преципитат ресуспендировали в 40 мл воды и, добавив 8 мл ПЭГ/NaCl, инкубировали во льду не менее 20 мин, после чего вновь проводили осаждение фагового преципитата при 5000 g в течение 30 мин. Супернатант вместе с остатками полиэтиленгликоля тщательно удаляли и ресуспендировали осадок в 2 мл ФСБ. Для удаления клеточного дебриса пробирки центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин. Выход фаговых частиц составлял приблизительно 10<sup>11</sup>-10<sup>13</sup> к.о.е.

### ***Обогащение библиотеки фаговыми антителами***

ОБМ и его гидролизат, растворенный в PBS в концентрации 10 мкг/мл, сорбировали в полистироловых пробирках (Nunc immunotube) в течение ночи при +4<sup>0</sup>С. Места неспецифического связывания блокировали 5% раствором сухого обезжиренного молока в ФСБ (МФСБ) в течение 2 часов при комнатной температуре. Фаговые частицы (3x10<sup>11</sup> к.о.е./мл) пред-инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в растворе МФСБ. Связывание между фаговыми частицами и молекулами ОБМ и его гидролизатом в растворе проводили 2 час при 37<sup>0</sup>С или при комнатной температуре. После инкубации все лунки промывали 10-20 раз раствором ФСБ, содержащим 0.1% Tween20, 10 раз раствором ФСБ. Связавшиеся фаговые частицы элюировали раствором 100 mM триэтиламина в течение 15 минут при комнатной температуре. После каждого раунда селекции определяли титр фаговых частиц в экспериментальных и контрольных лунках и рассчитывали их соотношение.

Полученным элюатом инфицировали клетки *E.coli* TG1, находящиеся в

экспоненциальной фазе роста. Клетки инкубировали 30 мин при 37<sup>0</sup>С, после чего центрифугировали при 3000g 10 мин и высевали на чашку Петри (24×24 см) с агаризованной средой 2хУТ, содержащей 1% глюкозу и 100 мкг/мл ампициллина. Чашки инкубировали в термостате при 30<sup>0</sup>С в течение ночи. На чашку с выросшими колониями добавляли 1-2мл среды 2хУТ, содержащей 20% глицерина, и шпателем собирали колонии. 50 мкл смывых бактериальных клеток использовали для инокуляции 50 мл 2хУТ, содержащей 100мкг/мл ампициллина и 1% глюкозы. Оставшиеся смывые бактериальные клетки замораживали в жидком азоте и хранили глицериновый сток при -70<sup>0</sup>С. Культуру клеток подращивали до A<sub>600</sub>=0.4. К 10 мл культуральной среды добавляли 5×10<sup>10</sup> фагов-помощников и инкубировали 30 мин при 37<sup>0</sup>С без качания. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин, осадки ресуспендировали в 50 мл среды 2хУТ, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, 25 мкг/мл канамицина и 0.1% глюкозы. Культуру растили в течение 8 – 12 часов при интенсивной аэрации при 30<sup>0</sup>С. Культуральную среду центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин и фаговые частицы осаждали 1/5 объема ПЭГ/NaCl. Полученные фаговые частицы переосаждали ПЭГ/NaCl и использовали для дальнейших раундов селекции.

## **МЕТОДЫ РАБОТЫ С ЭУКАРИОТИЧЕСКИМИ КЛЕТКАМИ**

### ***Ведение культуры эукариотических клеток линии СНО и НЕК-293***

Клетки выращивали в среде DMEM, содержащей 10% или 15% бычьей фетальной сыворотки для СНО и НЕК-293 соответственно и 2мМ L-глутамина, в инкубаторе при 37<sup>0</sup>С, 5% или 8% CO<sub>2</sub> для СНО и НЕК-293 соответственно и влажности 98% в культуральных флаконах (25 см<sup>2</sup>). При достижении монослоя клетки рассеивали. Отбирали культуральную среду, клетки промывали 5 мл стерильного 1хPBS, потом добавляли 0.5 мл 0.25% раствора трипсина в изотоническом буфере и инкубировали 1-2 минуты при 37<sup>0</sup>С до открепления клеток. Открепившиеся клетки смывали и ресуспендировали в 4.5 мл среды DMEM с 10% бычьей фетальной сыворотки. Затем клетки рассеивали 1/5 по объему суспензии.



### ***Приготовление музея эукариотических клеток***

При достижении 100% конфлюэнтности клетки открепляли от культуральной поверхности (в случае клеток линии СНО обработкой раствором трипсина, в случае клеток линии НЕК-293 ударом хлопком). Клеточную суспензию помещали в стерильные полипропиленовые центрифужные пробирки и центрифугировали при 800 g и температуре 10 °С в течение 5 минут.

Супернатант декантировали. Клеточный осадок незамедлительно ресуспендировали в смеси 90% бычьей фетальной сыворотке и 10% DMSO из расчета 1 мл на 2-3 миллиона клеток. Клеточную суспензию переносили в заранее подписанные криовialsы и помещали на -20°С на 1-2 часа до замораживания. Затем криовialsы переносили на -80°С и хранили 2-3 недели. Затем замороженные клетки переносили на хранение в танк с жидким азотом.

### ***Выведение линии эукариотических клеток из заморозки***

Криовиал с клетками размораживали в водяной бане с температурой 37°С в течение 1-2 минут. Клеточную суспензию незамедлительно переносили в стерильную центрифужную пробирку с 20-30 мл холодной бессывороточной среды и центрифугировали при 800 g и температуре 10°С в течение 5 минут.

Супернатант декантировали. Клеточный осадок незамедлительно ресуспендировали в смеси 5 мл теплой среды с 10% бычьей фетальной сыворотки. Суспензию клеток переносили в культуральный флакон (25 см<sup>2</sup>) и помещали в инкубатор при 37°С, 5% CO<sub>2</sub> и влажности 98%.

### ***Трансфицирование эукариотических клеток методом липофекции***

Перед проведением трансфекции плазмидные ДНК дополнительно очищаются от примесей РНК и солей. Липофекцию проводили с использованием Lipofectamine™ Reagent и Plus™ Reagent (Invitrogen, США) согласно рекомендации производителя. За день до проведения трансфекции высевали 2-6·10<sup>4</sup> клеток линии СНО или НЕК-293 в лунки 24-луночного

планшета в 500 мкл среды DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) без антибиотиков, содержащей 10% фетальной сыворотки.

Растворяли 0.4 мкг ДНК (по 0.2 мкг плазмиды, содержащей конструкции для экспрессии легкой и тяжелой цепей антитела) в 25 мкл среды без сыворотки и антибиотиков, добавляли 4 мкл Plus™ Reagent, перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Добавляли 1 мкл Lipofectamine™ Reagent в 25 мкл среды DMEM без сыворотки и антибиотиков, перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре (соотношение ДНК/Lipofectamine™ Reagent 1мкг/2.5мкл). Смешивали полученные растворы и добавляли по 50 мкл к клеткам. Перед добавлением липосом заменяли культуральную среду на 200 мкл среды DMEM без сыворотки и антибиотиков.

Инкубировали 3 часа при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и влажности 98%, затем добавляли равный объем среды с 20% фетальной сыворотки. Клетки выращивали в инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и влажности 98%. Анализировали культуральную среду через 48 часов.

## ВЫВОДЫ

1) В результате проведенной работы был отобран ряд одноцепочечных антител к ОБМ из фаг-дисплейной библиотеки больных РС. Впервые продемонстрирована *in vitro* кросс-реактивность полученного аутореактивного моноклонального IgG E2 по отношению к ОБМ и вирусному белку LMP1.

2) С использованием технологии Luminex показана полиреактивная природа ряда отобранных анти-ОБМ антител. Полученные данные, подтверждаемые структурной гомологией отобранных антител, свидетельствуют в поддержку непосредственного участия различных вирусов в индукции РС путем механизма молекулярной мимикрии.

3) Показано, что полиреактивность аутоантител при РС может реализовываться за счет сочетания двух цепей – тяжелой и легкой, при этом каждая из которых в большей степени отвечает за связывание своего антигена.

4) С помощью широкомасштабного секвенирования библиотек, предобогащенных на различные антигены, определены гены зародышевой линии, характерные для аутореактивных антител, специфичных к ОБМ (IGHV1-69, IGHV6-1, IGHV5-51, IGLV3-19, IGKV1-39), вирусному белку LMP1 (IGHV1-18, IGHV1-3, IGLV10-54, IGLV1-47), а также полиреактивных антител (IGHV4-59 и IGHV1-8).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 2006,**52**:61-76.
2. Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung HP. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 2006,**2**:201-211.
3. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, *et al.* The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 1989,**112** ( Pt 1):133-146.
4. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008,**372**:1502-1517.
5. Aktas O, Kieseier B, Hartung HP. Neuroprotection, regeneration and immunomodulation: broadening the therapeutic repertoire in multiple sclerosis. *Trends Neurosci* 2010,**33**:140-152.
6. Paty DW, Li DK. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1993,**43**:662-667.
7. He D, Guo R, Zhang F, Zhang C, Dong S, Zhou H. Rituximab for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2013,**12**:CD009130.
8. Stepanov AV, Belogurov AA, Jr., Ponomarenko NA, Stremovskiy OA, Kozlov LV, Bichucher AM, *et al.* Design of targeted B cell killing agents. *PLoS One* 2011,**6**:e20991.
9. Belogurov AA, Jr., Stepanov AV, Smirnov IV, Melamed D, Bacon A, Mamedov AE, *et al.* Liposome-encapsulated peptides protect against experimental allergic encephalitis. *FASEB J* 2013,**27**:222-231.
10. Kassmann CM, Lappe-Siefke C, Baes M, Brugger B, Mildner A, Werner HB, *et al.* Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat Genet* 2007,**39**:969-976.
11. Dutta R, Trapp BD. Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 2011,**93**:1-12.
12. Kivisakk P, Mahad DJ, Callahan MK, Sikora K, Trebst C, Tucky B, *et al.* Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Ann Neurol* 2004,**55**:627-638.
13. Chang TT, Sobel RA, Wei T, Ransohoff RM, Kuchroo VK, Sharpe AH. Recovery from EAE is associated with decreased survival of encephalitogenic T cells in the CNS of B7-1/B7-2-deficient mice. *Eur J Immunol* 2003,**33**:2022-2032.
14. Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, Heining P, Schmouder R, Francis G, *et al.* Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 2010,**9**:883-897.
15. Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, Opdenakker G, *et al.* Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2006,**203**:1007-1019.
16. Agrawal SM, Silva C, Tourtellotte WW, Yong VW. EMMPRIN: a novel regulator of leukocyte transmigration into the CNS in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 2011,**31**:669-677.
17. Siffrin V, Radbruch H, Glumm R, Niesner R, Paterka M, Herz J, *et al.* In vivo imaging of partially reversible th17 cell-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis. *Immunity* 2010,**33**:424-436.
18. Nikic I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, *et al.* A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med* 2011,**17**:495-499.
19. Yong VW, Marks S. The interplay between the immune and central nervous systems in neuronal injury. *Neurology* 2010,**74** Suppl 1:S9-S16.
20. Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, Raus J, Weiner HL, Hafler DA. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein

- in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 1994,**179**:973-984.
21. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006,**441**:235-238.
  22. Saxena A, Martin-Blondel G, Mars LT, Liblau RS. Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS Lett* 2011,**585**:3758-3763.
  23. Windhagen A, Anderson DE, Carrizosa A, Balashov K, Weiner HL, Hafler DA. Cytokine secretion of myelin basic protein reactive T cells in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1998,**91**:1-9.
  24. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 2003,**8**:223-246.
  25. Oreja-Guevara C, Ramos-Cejudo J, Aroeira LS, Chamorro B, Diez-Tejedor E. TH1/TH2 Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with Glatiramer acetate or Natalizumab. *BMC Neurol* 2012,**12**:95.
  26. Ahn J, Feng X, Patel N, Dhawan N, Reder AT. Abnormal levels of interferon-gamma receptors in active multiple sclerosis are normalized by IFN-beta therapy: implications for control of apoptosis. *Front Biosci* 2004,**9**:1547-1555.
  27. Furlan R, Bergami A, Lang R, Brambilla E, Franciotta D, Martinelli V, *et al.* Interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients decreases the number of circulating T cells producing interferon-gamma and interleukin-4. *J Neuroimmunol* 2000,**111**:86-92.
  28. Achiron A, Gurevich M, Friedman N, Kaminski N, Mandel M. Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis: unique gene expression of disease activity. *Ann Neurol* 2004,**55**:410-417.
  29. Link H. The cytokine storm in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1998,**4**:12-15.
  30. Liu J, Marino MW, Wong G, Grail D, Dunn A, Bettadapura J, *et al.* TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Med* 1998,**4**:78-83.
  31. Mohan N, Edwards ET, Cupps TR, Oliverio PJ, Sandberg G, Crayton H, *et al.* Demyelination occurring during anti-tumor necrosis factor alpha therapy for inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 2001,**44**:2862-2869.
  32. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* 1999,**53**:457-465.
  33. Theibich A, Dreyer L, Magyari M, Loch H. Demyelinating neurological disease after treatment with tumor necrosis factor alpha-inhibiting agents in a rheumatological outpatient clinic: description of six cases. *Clin Rheumatol* 2013.
  34. De Jager PL, Jia X, Wang J, de Bakker PI, Ottoboni L, Aggarwal NT, *et al.* Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet* 2009,**41**:776-782.
  35. Gregory AP, Dendrou CA, Attfield KE, Haghikia A, Xifara DK, Butter F, *et al.* TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. *Nature* 2012,**488**:508-511.
  36. Sharief MK, Hentges R. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1991,**325**:467-472.
  37. Tuller T, Atar S, Ruppin E, Gurevich M, Achiron A. Common and specific signatures of gene expression and protein-protein interactions in autoimmune diseases. *Genes Immun* 2013,**14**:67-82.
  38. Bielekova B, Komori M, Xu Q, Reich DS, Wu T. Cerebrospinal fluid IL-12p40, CXCL13 and IL-8 as a combinatorial biomarker of active intrathecal inflammation. *PLoS One* 2012,**7**:e48370.
  39. Kallaur AP, Oliveira SR, Colado Simao AN, Delicato de Almeida ER, Kaminami Morimoto H, Lopes J, *et al.* Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis

- patients and the association between progression and activity of the disease. *Mol Med Rep* 2013,**7**:1010-1020.
40. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, *et al.* Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 2007,**130**:1089-1104.
  41. Ponomarenko NA, Durova OM, Vorobiev, II, Belogurov AA, Telegin GB, Suchkov SV, *et al.* Catalytic activity of autoantibodies toward myelin basic protein correlates with the scores on the multiple sclerosis expanded disability status scale. *Immunol Lett* 2006,**103**:45-50.
  42. Ponomarenko NA, Durova OM, Vorobiev, II, Belogurov AA, Jr., Kurkova IN, Petrenko AG, *et al.* Autoantibodies to myelin basic protein catalyze site-specific degradation of their antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006,**103**:281-286.
  43. Derfuss T, Parikh K, Velhin S, Braun M, Mathey E, Krumbholz M, *et al.* Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009,**106**:8302-8307.
  44. Mathey EK, Derfuss T, Storch MK, Williams KR, Hales K, Woolley DR, *et al.* Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med* 2007,**204**:2363-2372.
  45. Elliott C, Lindner M, Arthur A, Brennan K, Jarius S, Hussey J, *et al.* Functional identification of pathogenic autoantibody responses in patients with multiple sclerosis. *Brain* 2012,**135**:1819-1833.
  46. Meinel E, Derfuss T, Krumbholz M, Probstel AK, Hohlfeld R. Humoral autoimmunity in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2011,**306**:180-182.
  47. von Budingen HC, Bar-Or A, Zamvil SS. B cells in multiple sclerosis: connecting the dots. *Curr Opin Immunol* 2011,**23**:713-720.
  48. Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat Rev Immunol* 2010,**10**:236-247.
  49. Krumbholz M, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinel E. B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurol* 2012,**8**:613-623.
  50. Blennow K, Fredman P, Wallin A, Gottfries CG, Frey H, Pirtila T, *et al.* Formulas for the quantitation of intrathecal IgG production. Their validity in the presence of blood-brain barrier damage and their utility in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1994,**121**:90-96.
  51. Gildeen DH. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2005,**4**:195-202.
  52. Foreman AL, Van de Water J, Gougeon ML, Gershwin ME. B cells in autoimmune diseases: insights from analyses of immunoglobulin variable (Ig V) gene usage. *Autoimmun Rev* 2007,**6**:387-401.
  53. Zhang Y, Da RR, Guo W, Ren HM, Hilgenberg LG, Sobel RA, *et al.* Axon reactive B cells clonally expanded in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Clin Immunol* 2005,**25**:254-264.
  54. von Budingen HC, Harrer MD, Kuenzle S, Meier M, Goebels N. Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of MS patients produce myelin-specific antibodies. *Eur J Immunol* 2008,**38**:2014-2023.
  55. Witebsky E, Rose NR, Terplan K, Paine JR, Egan RW. Chronic thyroiditis and autoimmunization. *J Am Med Assoc* 1957,**164**:1439-1447.
  56. Ravirajan CT, Rahman MA, Papadaki L, Griffiths MH, Kalsi J, Martin AC, *et al.* Genetic, structural and functional properties of an IgG DNA-binding monoclonal antibody from a lupus patient with nephritis. *Eur J Immunol* 1998,**28**:339-350.
  57. Pollinger B, Krishnamoorthy G, Berer K, Lassmann H, Bosl MR, Dunn R, *et al.* Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *J Exp Med* 2009,**206**:1303-1316.
  58. Fellouse FA, Esaki K, Birtalan S, Raptis D, Cancasci VJ, Koide A, *et al.* High-throughput generation of synthetic antibodies from highly functional minimalist phage-displayed libraries. *J Mol Biol* 2007,**373**:924-940.

59. Cabaugh CW, Almagro JC, Pogson M, Iverson B, Georgiou G. Synthetic antibody libraries focused towards peptide ligands. *J Mol Biol* 2008,**378**:622-633.
60. Pons J, Rajpal A, Kirsch JF. Energetic analysis of an antigen/antibody interface: alanine scanning mutagenesis and double mutant cycles on the HyHEL-10/lysozyme interaction. *Protein Sci* 1999,**8**:958-968.
61. Li Y, Urrutia M, Smith-Gill SJ, Mariuzza RA. Dissection of binding interactions in the complex between the anti-lysozyme antibody HyHEL-63 and its antigen. *Biochemistry* 2003,**42**:11-22.
62. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 1993,**363**:446-448.
63. Roux KH, Greenberg AS, Greene L, Strelets L, Avila D, McKinney EC, *et al.* Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998,**95**:11804-11809.
64. Vincke C, Loris R, Saerens D, Martinez-Rodriguez S, Muyldermans S, Conrath K. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J Biol Chem* 2009,**284**:3273-3284.
65. Noel D, Bernardi T, Navarro-Teulon I, Marin M, Martinetto JP, Ducancel F, *et al.* Analysis of the individual contributions of immunoglobulin heavy and light chains to the binding of antigen using cell transfection and plasmon resonance analysis. *J Immunol Methods* 1996,**193**:177-187.
66. Kumar S, Kalsi J, Ravirajan CT, Rahman A, Athwal D, Latchman DS, *et al.* Molecular cloning and expression of the Fabs of human autoantibodies in Escherichia coli. Determination of the heavy or light chain contribution to the anti-DNA/-cardiolipin activity of the Fab. *J Biol Chem* 2000,**275**:35129-35136.
67. Giles IP, Haley J, Nagl S, Latchman DS, Chen PP, Chukwuocha RU, *et al.* Relative importance of different human aPL derived heavy and light chains in the binding of aPL to cardiolipin. *Mol Immunol* 2003,**40**:49-60.
68. Sun M, Li L, Gao QS, Paul S. Antigen recognition by an antibody light chain. *J Biol Chem* 1994,**269**:734-738.
69. Pereira B, Benedict CR, Le A, Shapiro SS, Thiagarajan P. Cardiolipin binding a light chain from lupus-prone mice. *Biochemistry* 1998,**37**:1430-1437.
70. Galin FS, Maier CC, Zhou SR, Whitaker JN, Blalock JE. Murine V lambda x and V lambda x-containing antibodies bind human myelin basic protein. *J Clin Invest* 1996,**97**:486-492.
71. Da Silva GF, Harrison JS, Lai JR. Contribution of light chain residues to high affinity binding in an HIV-1 antibody explored by combinatorial scanning mutagenesis. *Biochemistry* 2010,**49**:5464-5472.
72. Acchione M, Lipschultz CA, DeSantis ME, Shanmuganathan A, Li M, Wlodawer A, *et al.* Light chain somatic mutations change thermodynamics of binding and water coordination in the HyHEL-10 family of antibodies. *Mol Immunol* 2009,**47**:457-464.
73. Sapparapu G, Planque SA, Nishiyama Y, Fong SK, Paul S. Antigen-specific proteolysis by hybrid antibodies containing promiscuous proteolytic light chains paired with an antigen-binding heavy chain. *J Biol Chem* 2009,**284**:24622-24633.
74. Hadzidimitriou A, Darzentas N, Murray F, Smilevska T, Arvaniti E, Tresoldi C, *et al.* Evidence for the significant role of immunoglobulin light chains in antigen recognition and selection in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009,**113**:403-411.
75. Avrameas S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today* 1991,**12**:154-159.
76. Aguilera I, Melero J, Nunez-Roldan A, Sanchez B. Molecular structure of eight human autoreactive monoclonal antibodies. *Immunology* 2001,**102**:273-280.
77. Crouzier R, Martin T, Pasquali JL. Heavy chain variable region, light chain variable region, and heavy chain CDR3 influences on the mono- and polyreactivity and on the affinity of human monoclonal rheumatoid factors. *J Immunol* 1995,**154**:4526-4535.

78. Ichiyoshi Y, Casali P. Analysis of the structural correlates for antibody polyreactivity by multiple reassortments of chimeric human immunoglobulin heavy and light chain V segments. *J Exp Med* 1994,**180**:885-895.
79. Ekiert DC, Kashyap AK, Steel J, Rubrum A, Bhabha G, Khayat R, *et al.* Cross-neutralization of influenza A viruses mediated by a single antibody loop. *Nature* 2012,**489**:526-532.
80. Barbas SM, Ditzel HJ, Salonen EM, Yang WP, Silverman GJ, Burton DR. Human autoantibody recognition of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995,**92**:2529-2533.
81. Larimore K, McCormick MW, Robins HS, Greenberg PD. Shaping of human germline IgH repertoires revealed by deep sequencing. *J Immunol* 2012,**189**:3221-3230.
82. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 2003,**301**:1374-1377.
83. Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Thomas S, Nussenzweig MC, Wardemann H. A checkpoint for autoreactivity in human IgM<sup>+</sup> memory B cell development. *J Exp Med* 2006,**203**:393-400.
84. Tiller T, Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Nussenzweig MC, Wardemann H. Autoreactivity in human IgG<sup>+</sup> memory B cells. *Immunity* 2007,**26**:205-213.
85. Michaelides MC, Eisen HN. The strange cross-reaction of menadione (vitamin K3) and 2,4-dinitrophenyl ligands with a myeloma protein and some conventional antibodies. *J Exp Med* 1974,**140**:687-702.
86. Mouquet H, Scheid JF, Zoller MJ, Krogsgaard M, Ott RG, Shukair S, *et al.* Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heteroligation. *Nature* 2010,**467**:591-595.
87. Porcheray F, DeVito J, Helou Y, Dargon I, Fraser JW, Nobecourt P, *et al.* Expansion of polyreactive B cells cross-reactive to HLA and self in the blood of a patient with kidney graft rejection. *Am J Transplant* 2012,**12**:2088-2097.
88. Jersild C, Fog T, Hansen GS, Thomsen M, Svejgaard A, Dupont B. Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. *Lancet* 1973,**2**:1221-1225.
89. Barcellos LF, Oksenberg JR, Begovich AB, Martin ER, Schmidt S, Vittinghoff E, *et al.* HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. *Am J Hum Genet* 2003,**72**:710-716.
90. Marrosu MG, Murru R, Murru MR, Costa G, Zavattari P, Whalen M, *et al.* Dissection of the HLA association with multiple sclerosis in the founder isolated population of Sardinia. *Hum Mol Genet* 2001,**10**:2907-2916.
91. Dymant DA, Herrera BM, Cader MZ, Willer CJ, Lincoln MR, Sadovnick AD, *et al.* Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance. *Hum Mol Genet* 2005,**14**:2019-2026.
92. Barcellos LF, Sawcer S, Ramsay PP, Baranzini SE, Thomson G, Briggs F, *et al.* Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2006,**15**:2813-2824.
93. Ramagopalan SV, Morris AP, Dymant DA, Herrera BM, DeLuca GC, Lincoln MR, *et al.* The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. *PLoS Genet* 2007,**3**:1607-1613.
94. Willer CJ, Dymant DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC, Canadian Collaborative Study G. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003,**100**:12877-12882.
95. Ebers GC, Sadovnick AD, Dymant DA, Yee IM, Willer CJ, Risch N. Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations in half-siblings. *Lancet* 2004,**363**:1773-1774.
96. International Multiple Sclerosis Genetics C, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, *et al.* Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 2007,**357**:851-862.



97. Landtblom AM, Flodin U, Soderfeldt B, Wolfson C, Axelson O. Organic solvents and multiple sclerosis: a synthesis of the current evidence. *Epidemiology* 1996;**7**:429-433.
98. Gaby A. Multiple Sclerosis. *Glob Adv Health Med* 2013;**2**:50-56.
99. Maas AG, Hogenhuis LA. Multiple sclerosis and possible relationship to cocoa: a hypothesis. *Ann Allergy* 1987;**59**:76-79.
100. Ehrentheil OF, Schulman MH, Alexander L. Role of food allergy in multiple sclerosis. *Neurology* 1952;**2**:412-426.
101. Charcot J-M. Histologie de la sclérose en plaques. *Gazette des hopitaux (Paris)* 1868:554-555, 557-558, 566.
102. Marie P. *Sclérose en plaques et maladies infectieuses*; 1884.
103. Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* 2005;**23**:367-386.
104. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 2005;**5**:230-242.
105. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 2012;**30**:429-457.
106. Zotos D, Tarlinton DM. Determining germinal centre B cell fate. *Trends Immunol* 2012;**33**:281-288.
107. Crotty S. The 1-1-1 fallacy. *Immunol Rev* 2012;**247**:133-142.
108. Shlomchik MJ, Weisel F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol Rev* 2012;**247**:52-63.
109. Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N Engl J Med* 2007;**357**:1903-1915.
110. Elgueta R, de Vries VC, Noelle RJ. The immortality of humoral immunity. *Immunol Rev* 2010;**236**:139-150.
111. Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, Delbos F, Megret J, Storck S, *et al.* Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol* 2009;**10**:1292-1299.
112. Narayan K, Dail D, Li L, Cadavid D, Amrute S, Fitzgerald-Bocarsly P, *et al.* The nervous system as ectopic germinal center: CXCL13 and IgG in lyme neuroborreliosis. *Ann Neurol* 2005;**57**:813-823.
113. Hooper DC, Phares TW, Fabis MJ, Roy A. The production of antibody by invading B cells is required for the clearance of rabies virus from the central nervous system. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;**3**:e535.
114. Pachner AR, Brady J, Narayan K. Antibody-secreting cells in the central nervous system in an animal model of MS: Phenotype, association with disability, and in vitro production of antibody. *J Neuroimmunol* 2007;**190**:112-120.
115. Corcione A, Casazza S, Ferretti E, Giunti D, Zappia E, Pistorio A, *et al.* Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:11064-11069.
116. Owens GP, Bennett JL, Gilden DH, Burgoon MP. The B cell response in multiple sclerosis. *Neurol Res* 2006;**28**:236-244.
117. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 2001;**184**:101-122.
118. Griffin DE. Recovery from viral encephalomyelitis: immune-mediated noncytolytic virus clearance from neurons. *Immunol Res* 2010;**47**:123-133.
119. Phares TW, Stohlman SA, Bergmann CC. Intrathecal humoral immunity to encephalitic RNA viruses. *Viruses* 2013;**5**:732-752.
120. Luzuriaga K, Sullivan JL. Infectious mononucleosis. *N Engl J Med* 2010;**362**:1993-2000.
121. Operskalski EA, Visscher BR, Malmgren RM, Detels R. A case-control study of multiple sclerosis. *Neurology* 1989;**39**:825-829.
122. Lindberg C, Andersen O, Vahlne A, Dalton M, Runmarker B. Epidemiological investigation of the association between infectious mononucleosis and multiple sclerosis. *Neuroepidemiology* 1991;**10**:62-65.

123. Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010,**67**:824-830.
124. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One* 2010,**5**.
125. Nielsen TR, Rostgaard K, Asklung J, Steffensen R, Oturai A, Jersild C, *et al*. Effects of infectious mononucleosis and HLA-DRB1\*15 in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009,**15**:431-436.
126. Goodin DS. The causal cascade to multiple sclerosis: a model for MS pathogenesis. *PLoS One* 2009,**4**:e4565.
127. Alotaibi S, Kennedy J, Tellier R, Stephens D, Banwell B. Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis. *JAMA* 2004,**291**:1875-1879.
128. Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D, *et al*. Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA* 2005,**293**:2496-2500.
129. Nielsen TR, Rostgaard K, Nielsen NM, Koch-Henriksen N, Haahr S, Sorensen PS, *et al*. Multiple sclerosis after infectious mononucleosis. *Arch Neurol* 2007,**64**:72-75.
130. Zaadstra BM, Chorus AM, van Buuren S, Kalsbeek H, van Noort JM. Selective association of multiple sclerosis with infectious mononucleosis. *Mult Scler* 2008,**14**:307-313.
131. DeLorenze GN, Munger KL, Lennette ET, Orentreich N, Vogelman JH, Ascherio A. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Arch Neurol* 2006,**63**:839-844.
132. Lunemann JD, Tintore M, Messmer B, Strowig T, Rovira A, Perkal H, *et al*. Elevated Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen-1 immune responses predict conversion to multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010,**67**:159-169.
133. Lunemann JD, Edwards N, Muraro PA, Hayashi S, Cohen JI, Munz C, *et al*. Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis. *Brain* 2006,**129**:1493-1506.
134. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005,**23**:683-747.
135. Chastain EM, Miller SD. Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease. *Immunol Rev* 2012,**245**:227-238.
136. Talbot PJ, Paquette JS, Ciurli C, Antel JP, Ouellet F. Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996,**39**:233-240.
137. Cheng W, Ma Y, Gong F, Hu C, Qian L, Huang Q, *et al*. Cross-reactivity of autoreactive T cells with MBP and viral antigens in patients with MS. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012,**17**:1648-1658.
138. Lang HL, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, *et al*. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol* 2002,**3**:940-943.
139. Wekerle H, Hohlfeld R. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2003,**349**:185-186.
140. Lunemann JD, Jelcic I, Roberts S, Lutterotti A, Tackenberg B, Martin R, *et al*. EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J Exp Med* 2008,**205**:1763-1773.
141. Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 2001,**1**:75-82.
142. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, *et al*. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 2007,**204**:2899-2912.

143. Peferoen LA, Lamers F, Lodder LN, Gerritsen WH, Huitinga I, Melief J, *et al.* Epstein Barr virus is not a characteristic feature in the central nervous system in established multiple sclerosis. *Brain* 2010,**133**:e137.
144. Sargsyan SA, Shearer AJ, Ritchie AM, Burgoon MP, Anderson S, Hemmer B, *et al.* Absence of Epstein-Barr virus in the brain and CSF of patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2010,**74**:1127-1135.
145. Albright AV, Lavi E, Black JB, Goldberg S, O'Connor MJ, Gonzalez-Scarano F. The effect of human herpesvirus-6 (HHV-6) on cultured human neural cells: oligodendrocytes and microglia. *J Neurovirol* 1998,**4**:486-494.
146. Chan PK, Ng HK, Cheng AF. Detection of human herpesviruses 6 and 7 genomic sequences in brain tumours. *J Clin Pathol* 1999,**52**:620-623.
147. Dockrell DH, Smith TF, Paya CV. Human herpesvirus 6. *Mayo Clin Proc* 1999,**74**:163-170.
148. Kim JS, Lee KS, Park JH, Kim MY, Shin WS. Detection of human herpesvirus 6 variant A in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *Eur Neurol* 2000,**43**:170-173.
149. Opsahl ML, Kennedy PG. Early and late HHV-6 gene transcripts in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter. *Brain* 2005,**128**:516-527.
150. Mirandola P, Stefan A, Brambilla E, Campadelli-Fiume G, Grimaldi LM. Absence of human herpesvirus 6 and 7 from spinal fluid and serum of multiple sclerosis patients. *Neurology* 1999,**53**:1367-1368.
151. Tejada-Simon MV, Zang YC, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ. Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2003,**53**:189-197.
152. Ramagopalan SV, Valdar W, Dyment DA, DeLuca GC, Yee IM, Giovannoni G, *et al.* Association of infectious mononucleosis with multiple sclerosis. A population-based study. *Neuroepidemiology* 2009,**32**:257-262.
153. Barnes DW, Whitley RJ. CNS diseases associated with varicella zoster virus and herpes simplex virus infection. Pathogenesis and current therapy. *Neurol Clin* 1986,**4**:265-283.
154. Tenser RB. Herpes simplex and herpes zoster. Nervous system involvement. *Neurol Clin* 1984,**2**:215-240.
155. Marrie RA, Wolfson C. Multiple sclerosis and varicella zoster virus infection: a review. *Epidemiol Infect* 2001,**127**:315-325.
156. Ordonez G, Pineda B, Garcia-Navarrete R, Sotelo J. Brief presence of varicella-zoster viral DNA in mononuclear cells during relapses of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2004,**61**:529-532.
157. Mancuso R, Delbue S, Borghi E, Pagani E, Calvo MG, Caputo D, *et al.* Increased prevalence of varicella zoster virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. *J Med Virol* 2007,**79**:192-199.
158. Sotelo J, Martinez-Palomo A, Ordonez G, Pineda B. Varicella-zoster virus in cerebrospinal fluid at relapses of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2008,**63**:303-311.
159. Burgoon MP, Cohrs RJ, Bennett JL, Anderson SW, Ritchie AM, Cepok S, *et al.* Varicella zoster virus is not a disease-relevant antigen in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2009,**65**:474-479.
160. Sospedra M, Zhao Y, zur Hausen H, Muraro PA, Hamashin C, de Villiers EM, *et al.* Recognition of conserved amino acid motifs of common viruses and its role in autoimmunity. *PLoS Pathog* 2005,**1**:e41.
161. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol* 2010,**20**:202-213.
162. Bray PF, Bloomer LC, Salmon VC, Bagley MH, Larsen PD. Epstein-Barr virus infection and antibody synthesis in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1983,**40**:406-408.
163. Zivadinov R, Nasuelli D, Tommasi MA, Serafin M, Bratina A, Ukmar M, *et al.* Positivity of cytomegalovirus antibodies predicts a better clinical and radiological outcome in multiple sclerosis patients. *Neurol Res* 2006,**28**:262-269.

164. Sundqvist E, Bergstrom T, Daialhosein H, Nystrom M, Sundstrom P, Hillert J, *et al.* Cytomegalovirus seropositivity is negatively associated with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013.
165. Horakova D, Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, Havrdova E, Qu J, Tamano-Blanco M, *et al.* Environmental factors associated with disease progression after the first demyelinating event: results from the multi-center SET study. *PLoS One* 2013,**8**:e53996.
166. Pirko I, Cardin R, Chen Y, Lohrey AK, Lindquist DM, Dunn RS, *et al.* CMV infection attenuates the disease course in a murine model of multiple sclerosis. *PLoS One* 2012,**7**:e32767.
167. Brok HP, Boven L, van Meurs M, Kerlero de Rosbo N, Celebi-Paul L, Kap YS, *et al.* The human CMV-UL86 peptide 981-1003 shares a crossreactive T-cell epitope with the encephalitogenic MOG peptide 34-56, but lacks the capacity to induce EAE in rhesus monkeys. *J Neuroimmunol* 2007,**182**:135-152.
168. Djelilovic-Vranic J, Alajbegovic A. Role of early viral infections in development of multiple sclerosis. *Med Arh* 2012,**66**:37-40.
169. Stroop WG, Schaefer DC. Production of encephalitis restricted to the temporal lobes by experimental reactivation of herpes simplex virus. *J Infect Dis* 1986,**153**:721-731.
170. Alvarez-Lafuente R, Garcia-Montojo M, De Las Heras V, Dominguez-Mozo MI, Bartolome M, Benito-Martin MS, *et al.* Herpesviruses and human endogenous retroviral sequences in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2008,**14**:595-601.
171. Kang JH, Sheu JJ, Kao S, Lin HC. Increased risk of multiple sclerosis following herpes zoster: a nationwide, population-based study. *J Infect Dis* 2011,**204**:188-192.
172. Garcia-Montojo M, De Las Heras V, Dominguez-Mozo M, Bartolome M, Garcia-Martinez MA, Arroyo R, *et al.* Human herpesvirus 6 and effectiveness of interferon beta1b in multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* 2011,**18**:1027-1035.
173. Perron H, Geny C, Laurent A, Mouriquand C, Pellat J, Perret J, *et al.* Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. *Res Virol* 1989,**140**:551-561.
174. Perron H, Garson JA, Bedin F, Beseme F, Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, *et al.* Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997,**94**:7583-7588.
175. Garson JA, Tuke PW, Giraud P, Paranhos-Baccala G, Perron H. Detection of virion-associated MSR-V-RNA in serum of patients with multiple sclerosis. *Lancet* 1998,**351**:33.
176. Sotgiu S, Mameli G, Serra C, Zarbo IR, Arru G, Dolei A. Multiple sclerosis-associated retrovirus and progressive disability of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010,**16**:1248-1251.
177. Rolland A, Jouvin-Marche E, Saresella M, Ferrante P, Cavaretta R, Creange A, *et al.* Correlation between disease severity and in vitro cytokine production mediated by MSR-V (multiple sclerosis associated retroviral element) envelope protein in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005,**160**:195-203.
178. Rolland A, Jouvin-Marche E, Viret C, Faure M, Perron H, Marche PN. The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *J Immunol* 2006,**176**:7636-7644.
179. Perron H, Lazarini F, Ruprecht K, Pechoux-Longin C, Seilhean D, Sazdovitch V, *et al.* Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. *J Neurovirol* 2005,**11**:23-33.
180. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 1994,**12**:433-455.
181. Huston JS, Mudgett-Hunter M, Tai MS, McCartney J, Warren F, Haber E, *et al.* Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Methods Enzymol* 1991,**203**:46-88.

182. Hoogenboom HR, de Bruine AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 1998,**4**:1-20.
183. Kay BK, Winter J, McCafferty J. *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*: Elsevier Science; 1996.
184. O'Connell D, Becerril B, Roy-Burman A, Daws M, Marks JD. Phage versus phagemid libraries for generation of human monoclonal antibodies. *J Mol Biol* 2002,**321**:49-56.
185. Rondot S, Koch J, Breitling F, Dubel S. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat Biotechnol* 2001,**19**:75-78.
186. Duenas M, Borrebaeck CA. Novel helper phage design: intergenic region affects the assembly of bacteriophages and the size of antibody libraries. *FEMS Microbiol Lett* 1995,**125**:317-321.
187. Sheets MD, Amersdorfer P, Finnern R, Sargent P, Lindquist E, Schier R, *et al.* Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998,**95**:6157-6162.
188. de Haard HJ, van Neer N, Reurs A, Hufton SE, Roovers RC, Henderikx P, *et al.* A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J Biol Chem* 1999,**274**:18218-18230.
189. Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, *et al.* Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol* 1996,**14**:309-314.
190. Улитин АБ, Капралова МВ, Ламан АГ, Шепеляковская АО, Булгакова ЕВ, Фурсова КК, *et al.* Библиотека миниантител человека в формате фагового дисплея. Создание и апробация. ДАН: Изд-во "Наука"; 2005.
191. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. Bypassing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 1991,**222**:581-597.
192. Gavilondo JV, Larrick JW. Antibody engineering at the millennium. *Biotechniques* 2000,**29**:128-132, 134-126, 138 passim.
193. Kipriyanov SM, Little M. Generation of recombinant antibodies. *Mol Biotechnol* 1999,**12**:173-201.
194. Amersdorfer P, Wong C, Smith T, Chen S, Deshpande S, Sheridan R, *et al.* Genetic and immunological comparison of anti-botulinum type A antibodies from immune and non-immune human phage libraries. *Vaccine* 2002,**20**:1640-1648.
195. Barbas CF, 3rd, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991,**88**:7978-7982.
196. Barbas CF, 3rd, Burton DR. Selection and evolution of high-affinity human anti-viral antibodies. *Trends Biotechnol* 1996,**14**:230-234.
197. Barbas CF, 3rd, Collet TA, Amberg W, Roben P, Binley JM, Hoekstra D, *et al.* Molecular profile of an antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries. *J Mol Biol* 1993,**230**:812-823.
198. Barbas CF, 3rd, Crowe JE, Jr., Cababa D, Jones TM, Zebedee SL, Murphy BR, *et al.* Human monoclonal Fab fragments derived from a combinatorial library bind to respiratory syncytial virus F glycoprotein and neutralize infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992,**89**:10164-10168.
199. Kim SJ, Jang MH, Stapleton JT, Yoon SO, Kim KS, Jeon ES, *et al.* Neutralizing human monoclonal antibodies to hepatitis A virus recovered by phage display. *Virology* 2004,**318**:598-607.
200. Burioni R, Williamson RA, Sanna PP, Bloom FE, Burton DR. Recombinant human Fab to glycoprotein D neutralizes infectivity and prevents cell-to-cell transmission of herpes simplex viruses 1 and 2 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994,**91**:355-359.
201. Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH. Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 1988,**240**:1041-1043.

202. Schmaljohn C, Cui Y, Kerby S, Pennock D, Spik K. Production and characterization of human monoclonal antibody Fab fragments to vaccinia virus from a phage-display combinatorial library. *Virology* 1999,**258**:189-200.
203. Labrijn AF, Koppelman MH, Verhagen J, Brouwer MC, Schuitemaker H, Hack CE, *et al.* Novel strategy for the selection of human recombinant Fab fragments to membrane proteins from a phage-display library. *J Immunol Methods* 2002,**261**:37-48.
204. Dantas-Barbosa C, Brigido MM, Maranhao AQ. Construction of a human Fab phage display library from antibody repertoires of osteosarcoma patients. *Genet Mol Res* 2005,**4**:126-140.
205. Schmidt A, Muller D, Mersmann M, Wuest T, Gerlach E, Garin-Chesa P, *et al.* Generation of human high-affinity antibodies specific for the fibroblast activation protein by guided selection. *Eur J Biochem* 2001,**268**:1730-1738.
206. Mao S, Gao C, Lo CH, Wirsching P, Wong CH, Janda KD. Phage-display library selection of high-affinity human single-chain antibodies to tumor-associated carbohydrate antigens sialyl Lewisx and Lewisx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999,**96**:6953-6958.
207. Pesce AJ, Apple R, Sawtell N, Michael JG. Cationic antigens. Problems associated with measurement by ELISA. *J Immunol Methods* 1986,**87**:21-27.
208. Chamczuk AJ, Ursell M, O'Connor P, Jackowski G, Moscarello MA. A rapid ELISA-based serum assay for myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Immunol Methods* 2002,**262**:21-27.
209. Lamboy JA, Tam PY, Lee LS, Jackson PJ, Avrantis SK, Lee HJ, *et al.* Chemical and genetic wrappers for improved phage and RNA display. *Chembiochem* 2008,**9**:2846-2852.
210. Belogurov AA, Jr., Kurkova IN, Friboulet A, Thomas D, Misikov VK, Zakharova MY, *et al.* Recognition and degradation of myelin basic protein peptides by serum autoantibodies: novel biomarker for multiple sclerosis. *J Immunol* 2008,**180**:1258-1267.
211. Fang CY, Chiang CY, Pan YR, Tse KP, Chang YS, Chang HY. Modulation of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activity by intrabodies. *Intervirology* 2007,**50**:254-263.
212. Greene MT, Ercolini AM, DeGutes M, Miller SD. Differential induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by myelin basic protein molecular mimics in mice humanized for HLA-DR2 and an MBP(85-99)-specific T cell receptor. *J Autoimmun* 2008,**31**:399-407.
213. Massilamany C, Asojo OA, Gangaplara A, Steffen D, Reddy J. Identification of a second mimicry epitope from *Acanthamoeba castellanii* that induces CNS autoimmunity by generating cross-reactive T cells for MBP 89-101 in SJL mice. *Int Immunol* 2011,**23**:729-739.
214. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995,**80**:695-705.
215. Quach TD, Manjarrez-Orduno N, Adlowitz DG, Silver L, Yang H, Wei C, *et al.* Anergic responses characterize a large fraction of human autoreactive naive B cells expressing low levels of surface IgM. *J Immunol* 2011,**186**:4640-4648.
216. Lefranc MP, Giudicelli V, Ginestoux C, Jabado-Michaloud J, Folch G, Bellahcene F, *et al.* IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res* 2009,**37**:D1006-1012.
217. Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 2008,**36**:W503-508.
218. Watson CT, Steinberg KM, Huddleston J, Warren RL, Malig M, Schein J, *et al.* Complete haplotype sequence of the human immunoglobulin heavy-chain variable, diversity, and joining genes and characterization of allelic and copy-number variation. *Am J Hum Genet* 2013,**92**:530-546.

219. Boyd SD, Gaeta BA, Jackson KJ, Fire AZ, Marshall EL, Merker JD, *et al.* Individual variation in the germline Ig gene repertoire inferred from variable region gene rearrangements. *J Immunol* 2010,**184**:6986-6992.
220. Lee SY, Rasheed S. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. *Biotechniques* 1990,**9**:676-679.
221. Alamyar E, Giudicelli V, Li S, Duroux P, Lefranc MP. IMGT/HighV-QUEST: the IMGT(R) web portal for immunoglobulin (IG) or antibody and T cell receptor (TR) analysis from NGS high throughput and deep sequencing. *Immunome Res* 2012,**8**:26.
222. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970,**227**:680-685.
223. Wisdom GB. Molecular weight determinations using polyacrylamide gel electrophoresis with tris-tricine buffers. *Methods Mol Biol* 1997,**73**:97-100.
224. Harlow E, Lane D. *Antibodies : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 8. Олигонуклеотиды, использованные в работе.

№	название	Нуклеотидная последовательность
1	Cg1_1	CTCCTCTCGAGCGCGGTACATGGCACCCACCTCTCTTGCA
2	Cg1_2	CTCTGCAGAGAGAAGATGGGAGTACTGGAATC
3	Cg1_3	TCTCTGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC
4	Cg1_4	GAGAAGGGATCCGGGAGCGGGGCTTGCCGGCCGTCGCACTCA
5	For_Hcthyr	ATACTCTGTACATTCCGAGGTGCAGCTGGTGGA
6	Rev_Hc_A17,thyr	ATTATACTCGAGACGGTGACCAGGGTACCTTG
7	For_HcA17	ATACTCTGTACATTCCCAGGTGCAGCTG
8	For_HcE2	GAGGCACTCGAGACGGTGACCGTGGTACCCTGGCC
9	Rev_HcE2	ATACTCTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGGTG
10	Lead/J	TCTAGAGGTCAGTCAGTACTGGTCTTCGGCGGAGGTACCAAGCTTACCGTACTAGT GACAGGTGGTCAGACT
11	Cl-2_1	AGGGACCAAGCTTACCGTCCTAGGTGAGTCTCTTC
12	Cl-2_2	CACCTGACCACCTGTCCTGTGATCTCTCGGG
13	Cl-2_3	GATCACAGGACAGGTGGTCAGGTGTCTAAGGTAAAAC
14	Cl-2_4	AGGAGATCTCGAGGCTAGGAATTATATGTGAGAAAAGA
15	LcE2_for	AATCTTAAGCTTGGTCCCTCCGCCGAATAC
16	LcE2_rev	ATCATATCTAGAGGCCAGTCTGCCCTGACACA
17	For_LcA17	ATCTAATCTAGAGGCCAGTCTGTGCTGAC
18	For_Lcthyr	ATCTAATCTAGAGGCTCTTCTGAGCTGACTCAG
19	Rev_Lc	GTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTTAAGATT
20	For_Lc	TGTATTTTTGCTTTTCTGGATTCCAGCCTC
21	Seq lib for PelB	GCAGCCGCTGGATTGTTACT
22	Vh4-6rev	GCTAGCTGAGGAGACGGTGACC
23	Vh3rev	GCTAGCTGAAGAGACGGTGACC
24	Vh12rev	GCTAGCTGAGGAGACAGTGACC
25	For light	CGGTTTCAGGCGGAGGTGGCT
26	Seq lib cmyc rev	CCCCATTCAGATCCTCTTCTGA