

УДК 577.123

СКОРОСТЬ ЗАГРУЗКИ ЧУЖЕРОДНЫХ И АУТОАНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ НА ГЛАВНЫЙ КОМПЛЕКС ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ВТОРОГО КЛАССА ОПОСРЕДУЕТ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К РАЗВИТИЮ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

А. Э. Мамедов^{1,*}, М. Ю. Захарова^{1,2}, О. О. Фаворова², О. Г. Кулакова²,
А. Н. Бойко², В. Д. Кнорре^{1,**}, Н. А. Воробьева³, Е. Н. Хурс⁴, И. С. Киселев²,
Н. М. Баулина², академик РАН А. Г. Габиров^{1,5}, А. А. Белогуров^{1,5}

Поступило 29.08.2018 г.

В результате генетического анализа тысячи больных рассеянным склерозом (РС) и здоровых доноров русской принадлежности было выявлено, что носительство групп аллелей HLA-DRB1*15 и HLA-DRB1*03 связано с риском РС, в то время как носительство групп аллелей HLA-DRB1*01 и HLA-DRB1*11 является протективным. Рекомбинантный HLA-DRB1*01:01 способен с довольно высокой аффинностью распознавать фрагменты основного белка миелина (МВР), одного из аутоантигенов при РС, однако при сравнении кинетических параметров загрузки пептидов МВР и вирусного НА на HLA-DRB1*01:01, катализируемой HLA-DM, была показана значительно более низкая скорость обмена CLIP на пептиды МВР. Мы предполагаем, что наблюдаемые протективные свойства группы аллелей HLA-DRB1*01 могут быть непосредственно связаны со способностью HLA-DRB1*01:01 кинетически различать пептиды экзогенной и эндогенной природы.

Ключевые слова: основной белок миелина, рассеянный склероз, главный комплекс гистосовместимости класса II, человеческий лейкоцитарный антиген, протективный аллель, библиотека эпитопов, гемоглютинин, генетическая предрасположенность к заболеванию.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524852238-241>

Риск развития тяжёлого аутоиммунного нейродегенеративного процесса, каковым является рассеянный склероз (РС), возрастает у лиц, несущих определённые варианты молекул главного комплекса гистосовместимости второго класса (ГКГС II или HLA II). При этом наблюдается выраженная изменчивость риска возникновения РС, зависящая от этнической принадлежности. Некоторые аллели генов HLA могут оказывать и защитное влияние, понижая эпидемиологическую вероятность возникновения этого недуга [1].

Цель настоящего исследования — выяснить возможные причины столь разнонаправленного действия вариантов HLA и проанализировать распределение аллелей высокополиморфного локуса HLA-DRB1 — главной генетической детерминанты развития РС [2].

Исследовали более тысячи больных РС и здоровых лиц русской этнической принадлежности. Изучали аллельное распределение HLA-DRB1 у 565 неродственных пациентов с РС и у 471 здорового донора с использованием двухцифрового генотипирования низкого разрешения на уровне групп аллелей. Наблюдались значительные различия в частоте носительства нескольких групп аллелей HLA-DRB1 (далее — “аллели”). Аллели HLA-DRB1*03 и *15 были высокозначимо ассоциированы с риском РС ($p_{\text{perm}} = 0,0056$; OR = 1,77 [CI: 1,27–2,49] и $p_{\text{perm}} = 5,8 \cdot 10^{-14}$; OR = 2,84 [CI: 2,17–3,72] соответственно). Аллели HLA-DRB1*01, *09, *11 и *12 были достоверно чаще представлены в контрольной группе, однако после коррекции на число сравнений только негативные ассоциации с аллелями HLA-DRB1*01 и *11 сохраняли значимость ($p_{\text{perm}} = 0,00062$; OR = 0,55 [CI: 0,41–0,74] и $p_{\text{perm}} = 0,0011$; OR = 0,56 [CI: 0,42–0,76] соответственно).

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии наук, Москва

² Российский национальный исследовательский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

³ Институт биологии гена Российской Академии наук, Москва

⁴ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской Академии наук, Москва

⁵ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

*E-mail: bioaz12@gmail.com

**E-mail: vera.knorre@gmail.com

Таким образом, у этнических русских мы обнаружили аллели гена *HLA-DRB1*, ассоциированные с риском РС (*03 и *15), и аллели, обладающие протективным действием (*01 и *11). Аллель *HLA-DRB1*15* широко известен как самый сильный генетический фактор риска РС для большинства европейских популяций (OR = 3,08) [2]. Его ассоциация с РС у русских была показана ранее на независимой ограниченной выборке [1, 3]. Что касается аллеля риска *DRB1*03* и протективных аллелей *01 и *11, ассоциацию которых с РС мы впервые выявили у русских, то их ассоциацию с РС ранее наблюдали для ряда популяций из числа исследованных [3].

По всей видимости, предрасположенность к развитию РС может определяться специфичностью соответствующих молекул ГКГС II к антигенным

пептидным репертуарам. Для проверки этой гипотезы мы решили исследовать связывание пептидов основного белка миелина (myelin basic protein, MBP), одного из аутоантигенов, характерных для РС, с белками, кодируемыми наиболее значимо, по нашим данным, ассоциированными с РС аллелями гена *DRB1*: протективного аллеля *01 и аллеля риска *15. Мы получили рекомбинантные генетические конструкции, кодирующие аллели *HLA-DRB1*01:01* и *15:01, поскольку эти аллели являются наиболее распространёнными среди соответствующих групп аллелей [http://allelefreqencies.net/hla6006a.asp].

С использованием ранее созданной библиотеки эпитопов MBP [4] мы показали, что рекомбинантный *HLA-DRB1*01:01* распознаёт несколько фрагментов MBP: он специфически связывается (рис. 1)

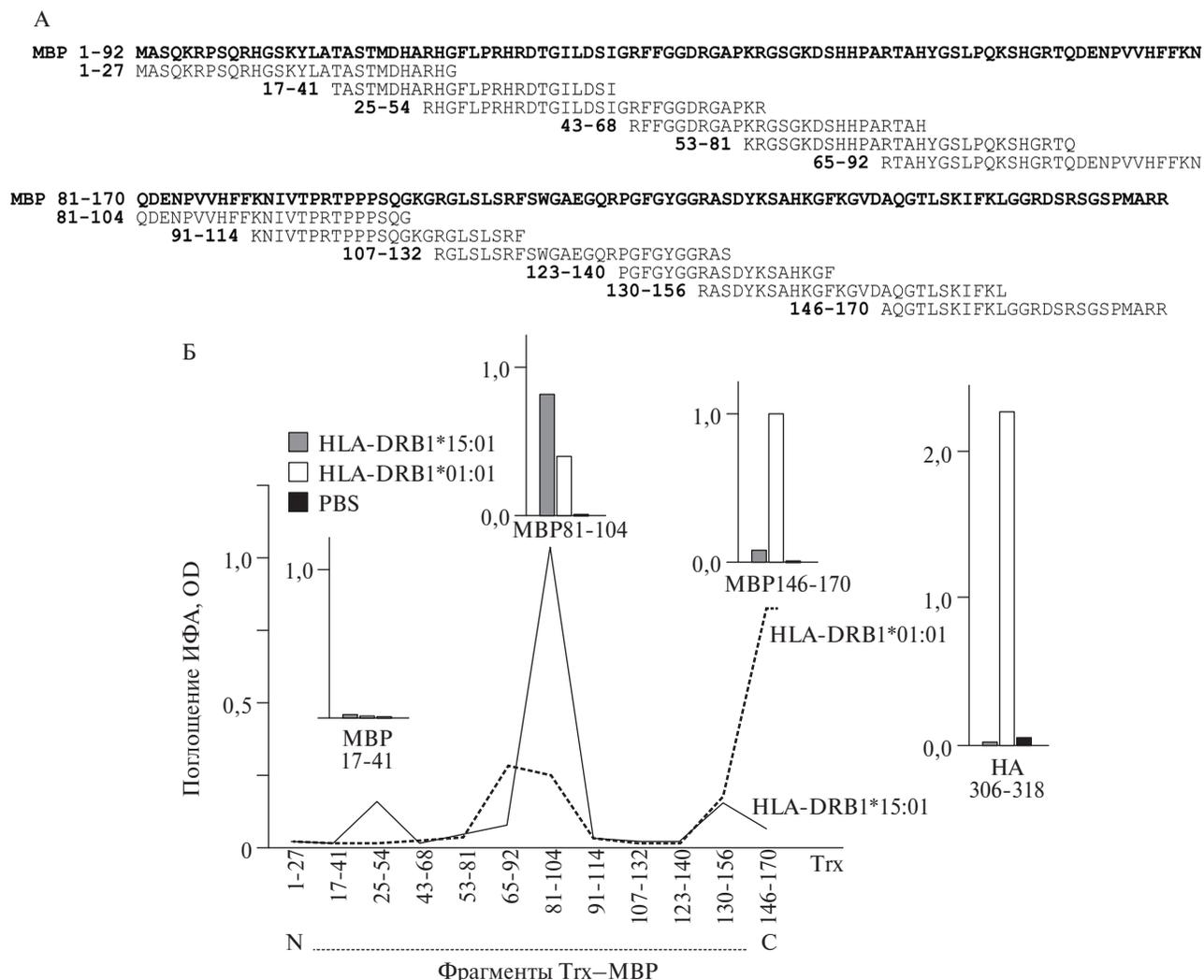


Рис. 1. *HLA-DRB1*01:01* распознаёт энцефалитогенные и С-концевые фрагменты основного белка миелина. (А) — аминокислотная последовательность MBP. Показаны перекрывающиеся пептиды библиотеки эпитопов. (Б) — анализ связывания *HLA-DRB1*15:01* (серые столбики) и *HLA-DRB1*01:01* (белые столбики) с библиотекой эпитопов MBP. Здесь и на рис. 2 Тгх — тиоредоксин. Отдельно показано узнавание химически синтезированных пептидов, представляющих MBP-фрагменты и пептид HA₃₀₆₋₃₁₈. Чёрные столбики — фоновый сигнал (PBS).

с С-концевым пептидом MBP_{146–170} и менее эффективно с тремя другими фрагментами — MBP_{130–156}, MBP_{81–104} (так называемый энцефалитогенный пептид MBP_{81–104} [4]) и MBP_{65–92}. Константа диссоциации K_D комплекса ГКГСII—пептид может характеризовать силу, которая требуется для удаления полностью связанного пептида из связывающей борозды ГКГС II. Мы измерили K_D для комплексов HLA-DRB1*01:01 с миелиновыми пептидами MBP_{81–104} и MBP_{146–170}, а также с классической антигенной детерминантой HLA-DRB1*01:01 — пептидом 306–318 гемагглютинина (HA) вируса гриппа [5] (рис. 1). Для этой цели мы использовали химически синтезированные пептиды и рекомбинантные пептиды, слитые с белком-носителем, тиоредоксином. Константа диссоциации комплексов MBP_{81–104} и MBP_{146–170} с HLA-DRB1*01:01 сравнима с таковой в случае вирусного пептида HA_{306–318}. На основании этих данных можно предположить, что дискриминация пептидов соответствующими вариантами ГКГС II, по всей видимости, происходит не на термодинамическом уровне.

Известно, что процесс обмена пептида CLIP на антигенные пептиды в случае ГКГС II носит динамический характер и происходит с участием HLA-DM [6, 7]. Наши данные свидетельствуют о том, что во время этого процесса, несмотря на сходную аффинность, синтетический пептид HA вытесняет CLIP, загруженный на HLA-DRB1*01:01, значительно быстрее по сравнению с пептидами MBP_{81–104} и MBP_{146–170}, тогда как HLA-DRB1*15:01 связывает MBP_{81–104} аналогично скорости взаимодействия HLA-DRB1*01:01 и HA (рис. 2). Изучение загрузки этих пептидов в составе белков, слитых с тиоредоксином, на ГКГС II привело к идентичным результатам. Мы предполагаем, что наблюдаемые протективные свойства группы аллелей HLA-DRB1*01 могут быть непосредственно связаны со способностью HLA-DRB1*01:01 кинетически различать пептиды экзогенной и эндогенной природы.

Таким образом, в настоящей работе мы показали, что наиболее распространённый HLA-DRB1*01:01, кодируемый соответствующим протективным аллелем HLA-DRB1, парадоксальным образом связывает

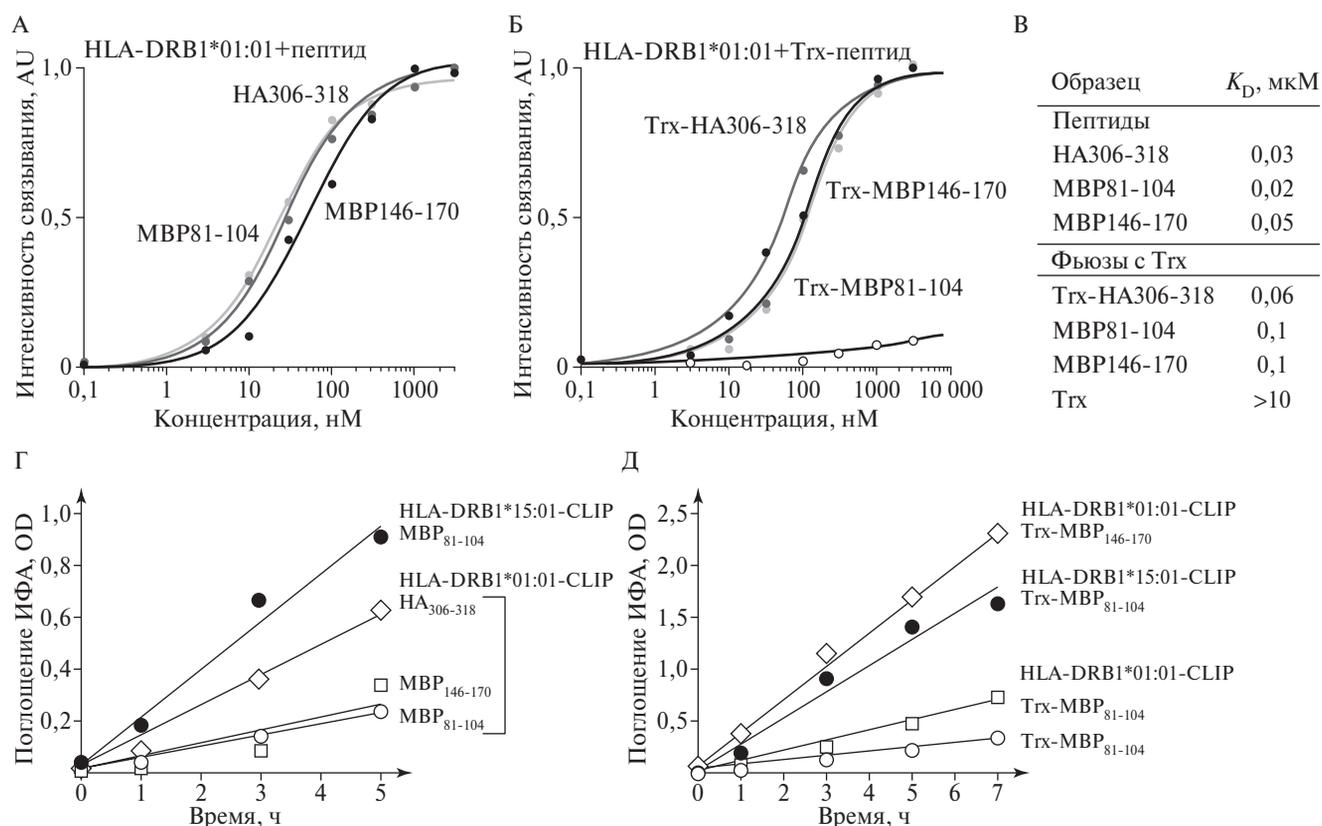


Рис. 2. HLA-DRB1*01:01 кинетически различает пептиды со схожей термодинамической аффинностью. Связывание, измеренное с помощью DELFIA, с HLA-DRB1*01:01 химически синтезированных пептидов HA_{306–318} (серая кривая), MBP_{81–104} (светло-серая кривая) и MBP_{146–170} (чёрная кривая) (А) и их аналогов, слитых с тиоредоксином (Б). Константы диссоциации суммированы в (В). Связывание химически синтезированных пептидов (Г) и их рекомбинантных аналогов, слитых с тиоредоксином (Д), содержащих HA_{306–318} (ромбы), MBP_{81–104} (круги) и MBP_{146–170} (квадраты) и предварительно загруженных CLIP HLA-DRB1*01:01 и HLA-DRB1*15:01 в присутствии HLA-DM.

фрагменты МВР с аффинностью, сравнимой с аффинностью экзогенных антигенов на примере вирусного пептида НА. Высказанная нами гипотеза о превалировании “кинетической компоненты” в процессе распознавания пептидов ГКГС II получила экспериментальное подтверждение. Важным следствием, вытекающим из нашей работы, является наблюдение радикально различающейся скорости загрузки антигенных пептидов на ГКГС II при их сравнимой термодинамической аффинности. Это, в свою очередь, указывает на необходимость проведения кинетических исследований лигандов ГКГС II независимо от их аффинности для более корректной оценки их физиологической значимости. Существует мнение, что время загрузки ГКГС II в поздней эндосоме ограничено несколькими часами [8], поэтому вполне вероятно, что пептиды с высокой аффинностью, но с низкой скоростью связывания будут представлены на поверхности клетки существенно меньше в сравнении с менее аффинными, но кинетически более предпочтительными пептидами. Данное предположение позволяет предсказать ограниченную способность HLA-DRB1*01:01 презентировать миелиновые пептиды на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Обнаружение явления “кинетической регуляции” процесса загрузки пептидов на ГКГС II может иметь, на наш взгляд, не только фундаментальное значение. Этот феномен может быть с успехом использован для создания специфических лекарственных соединений на основе пептидов и пептидомиметиков.

Источник финансирования. Работа поддержана грантом РФФИ 17–74–30019.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sudomoina M.A., Boiko A.N., Demina T.L., Gusev E.I., Boldyreva M.N., Trofimov D.Y., Alekseev L.P., Favorova O.O.* Association of Multiple Sclerosis in the Russian Population with HLA-DRB1 Gene Alleles // *Mol. Biol.* 1998. V. 32. P. 291–296.
2. *Canto E., Oksenberg J.R.* Multiple Sclerosis Genetics // *Mult. Scler.* 2018. V. 24. P. 75–79.
3. *Ramagopalan S.V., Ebers G.C.* Multiple Sclerosis: Major Histocompatibility Complexity and Antigen Presentation // *Genome Med.* 2009. V. 1. P. 1–5.
4. *Belogurov A.A., Kurkova I.N., Friboulet A., Thomas D., Misikov V.K., Zakharova M.Y., Suchkov S.V., Kotov S.V., Alehin A.I., Avalle B., Souslova E.A., Morse H.C. 3rd, Gabibov A.G., Ponomarenko N.A.* Recognition and Degradation of Myelin Basic Protein Peptides by Serum Autoantibodies: Novel Biomarker for Multiple Sclerosis // *J. Immunol.* 2008. V. 180. P. 1258–1267.
5. *Stern L.J., Brown J.H., Jardetzky T.S., Gorga J.C., Urban R.G., Strominger J.L., Wiley D.C.* Crystal Structure of the Human Class II MHC Protein HLA-DR1 Complexed with an Influenza Virus Peptide // *Nature.* 1994. V. 368. P. 215–221.
6. *Anders A.K., Call M.J., Schulze M.S., Fowler K.D., Schubert D.A., Seth N.P., Sundberg E.J., Wucherpfennig K.W.* HLA-DM Captures Partially Empty HLA-DR Molecules for Catalyzed Removal of Peptide // *Nat. Immunol.* 2011. V. 12. P. 54–61.
7. *Yin L., Maben Z.J., Becerra A., Stern L.J.* Evaluating the Role of HLA-DM in MHC Class II–Peptide Association Reactions // *J. Immunol.* 2015. V. 195. P. 706–716.
8. *Rabinowitz J.D., Vrljic M., Kasson P.M., Liang M.N., Busch R., Boniface J.J., Davis M.M., McConnell H.M.* Formation of a Highly Peptide-Receptive State of Class II MHC // *Immunity.* 1998. V. 9. P. 699–709.

LOADING RATE OF EXOGENOUS AND AUTOANTIGENIC DETERMINANTS ON MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II MEDIATES RESISTANCE TO MULTIPLE SCLEROSIS

A. E. Mamedov, M. Y. Zakharova, O. O. Favorova, O. G. Kulakova, A. N. Boyko, V. D. Knorre, N. A. Vorobieva, E. N. Khurs, I. C. Kiselev, N. M. Baulina, Academician of the RAS A. G. Gabibov, A. A. Belogurov, Jr.

Received August 29, 2018

Genetic analysis of thousands of patients with multiple sclerosis (MS) and healthy Russian donors showed that the carriage of groups of HLA-DRB1*15 and HLA-DRB1*03 alleles is associated with the risk of MS, whereas the carriage of groups of HLA-DRB1*01 and HLA-DRB1*11 alleles is protective. Recombinant HLA-DRB1*01:01 with a high affinity can recognize the fragments of myelin basic protein (MBP), one of the autoantigens in MS. However, the comparison of the kinetic parameters of the load of MBP and viral HA peptides on HLA-DRB1*01:01, which is catalyzed by HLA-DM, showed a significantly lower rate of exchange of CLIP for MBP peptides. We assume that the observed protective properties of the group of HLA-DRB1*01 alleles may be directly associated with the ability of HLA-DRB1*01:01 to kinetically distinguish peptides of exogenous and endogenous nature.

Keywords: myelin basic protein, multiple sclerosis, major histocompatibility complex class II, human leukocyte antigen, protective allele, epitope library, hemagglutinin, genetic predisposition to disease.