

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Кузина Екатерина Сергеевна

**УБИКВИТИН-НЕЗАВИСИМЫЙ ПРОТЕОЛИЗ ОСНОВНОГО БЕЛКА
МИЕЛИНА И ЕГО РОЛЬ В РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
АУТОИММУННОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА.**

Специальность 02.00.10 – «биоорганическая химия»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научные руководители:
канд. хим. наук Белогуров А.А.
доктор хим. наук, профессор,
чл.-корр. РАН Габиров А.Г.

МОСКВА – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
Протеасома	9
Структура и каталитические свойства протеасомы.....	9
Иммунопротеасома	14
Система убиквитинилирования. Убиквитин-зависимый и убиквитин-независимый протеолиз	17
Ингибиторы протеасомы.....	20
Презентация антигенов на молекулах главного комплекса гистосовместимости	25
Рассеянный склероз	31
Общая характеристика заболевания.....	31
Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит.....	33
Роль Т-клеток в развитии рассеянного склероза и ЕАЕ.....	34
Основной белок миелина.....	37
Роль протеасомы в развитии РС и ЕАЕ	40
Современные подходы к терапии рассеянного склероза	42
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	46
Исследование роли модификации МВР убиквитином в процессе деградации протеасомой.....	46
Внутриклеточная деградация МВР протеасомой в клетках млекопитающих	46
Протеолиз МВР 26S протеасомой <i>in vitro</i>	52
Изучение влияния заряда МВР на эффективность убиквитин-независимого протеолиза.....	54
Анализ физиологической значимости деградации МВР иммунопротеасомой.....	59
Изучение баланса протеасома-иммунопротеасома в ЦНС при развитии ЕАЕ.	59
Локализация иммуносубъединиц иммунопротеасомы в структурах головного мозга на клеточном уровне.....	62
Сравнение спектров деградации МВР конститутивной протеасомой и иммунопротеасомой..	63
Исследование образования пептида МВР ₈₃₋₉₀ под действием иммунопротеасомы субъединичного состава $\beta 1^{\text{high}}\beta 51^{\text{low}}$	68
Свидетельство презентации пептида МВР ₈₃₋₉₀ на МНС I и анализ цитотоксического действия МВР ₈₃₋₉₀ -специфических Т-клеток на олигодендроциты.	69
Подходы к направленному подавлению гидролиза МВР протеасомой для терапии ЕАЕ	72
Использование малых интерферирующих РНК.....	72
Использование ингибиторов протеасомы.....	73
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	79
Химические реактивы и сопутствующие материалы.	79
Растворы.....	81
Работа с белками	82
Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле.	82

Окрашивание ПААГ Кумасси синим R-250 с усилением контраста солью меди	83
Иммуноблоттинг	83
Электрофорез в неденатурирующих условиях.....	83
Иммунопреципитация.....	84
Работа с эукариотическими клетками.....	84
Методы работы с эукариотическими клетками линии НЕК и HeLa.....	84
Получение культуры зрелых олигодендроцитов	85
Получение активированных CD8+ Т-клеток.....	86
Определение цитотоксической активности CD8+ Т-клеток.....	86
Иммуноцитохимическое окрашивание культур олигодендроцитов	87
Индукция ЕАЕ у экспериментальных мышей.....	87
Иммуногистохимия.....	87
Получение очищенного препарата протеасомы.....	88
Фракционирование протеасомы ультрацентрифугированием.....	89
Выделение, ацетилирование и деиминирование MBP	89
Убиквитинилирование in vitro	90
Протеолиз белков in vitro	90
Определение кинетических параметров ингибирования протеасомы	91
Методы масс-спектрометрического анализа	92
Тандемный хромато-масс-спектрометрический анализ	92
Масс-спектрометрический анализ нативного белка (Top-down).....	93
Масс-спектрометрия с мониторингом множественных реакций	93
Поверхностный плазмонный резонанс	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ.....	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	98

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а.о. – аминокислотный остаток

Ат – антитело

АТФ - аденозинтрифосфат

АПК – антигенпредставляющая клетка

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДМСО – диметилсульфоксид

ИП - иммунопреципитация

кДа – килодальтон

ПААГ – полиакриламидный гель

РС – рассеянный склероз

ТКР – т-клеточный рецептор

ЦНС – центральная нервная система

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

BSA – бычий сывороточный альбумин (bovine serum albumin)

CaM - кальмодулин

EAE – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (experimental autoimmune encephalomyelitis)

GA – глатирамера ацетат (glatiramer acetate)

HLA – лейкоцитарный антиген человека (Human Leucocyte Antigen)

IFN – интерферон

IgG – иммуноглобулины класса G

IL – интерлейкин

MBP – основной белок миелина (myelin basic protein)

MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex)

MOG – миелин-олигодендрокитарный гликопротеин (myelin oligodendrocyte glycoprotein)

MRM – мониторинг множественных реакций (multiple reaction monitoring)

ODC – орнитиндекарбоксилаза (ornithine decarboxylase)

PBS – фосфатно-солевой буфер (phosphate buffered saline)

PLP – протеолипидный белок (proteolipid protein)

SDS – додецилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfate)

SPR – поверхностный плазмонный резонанс (surface plasmon resonance)

siRNA – малая интерферирующая РНК (Small interfering RNA)

TBS – солевой буфер на основе трис(гидроксиметил)аминометана (tris-buffered saline)

Th – Т-хелперы

Tr, Treg – Т-регуляторные клетки

WB – вестерн-блоттинг (western blotting)

ВВЕДЕНИЕ

Одним из распространенных аутоиммунных заболеваний является рассеянный склероз (РС) – хроническое воспалительное нейродегенеративное заболевание с неизвестной этиологией. Патогенез данного заболевания включает в себя повреждение миелиновой оболочки нервных волокон, что приводит к постепенной утрате целого ряда функций центральной нервной системы, связанных с физическим и психоэмоциональным состоянием больного. Первые эпизоды РС обычно происходят в молодом возрасте (20-40 лет) и в этой связи последующая инвалидизация больных обуславливает важное социально-экономическое значение РС. Заболевание длится годами, и терапия больных РС ложится тяжким бременем на бюджеты большинства развитых стран. Из-за неясности этиологии на сегодняшний день не существует радикального способа терапии, приводящего к полному излечению пациента. Современные лекарства в своем большинстве действуют на клетки иммунной системы, подавляя процессы воспаления, тем самым уменьшают лишь частоту обострений или несколько замедляют развитие заболевания. Для изучения фундаментальных основ развития аутоиммунной нейродегенерации и, в частности, РС, а также для проведения доклинических испытаний различных фармацевтических препаратов используется экспериментальная животная модель РС – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ).

Одним из основных аутоантигенов, на который направлен иммунный ответ при рассеянном склерозе и ЕАЕ, является основной белок миелина (myelin basic protein, МВР). Известно, что экспрессия основного белка миелина в организме млекопитающих обнаруживается исключительно в центральной и периферической нервных системах. Данный белок содержится в мембране специализированных клеток, формирующих миелиновую оболочку аксонов, – олигодендроцитов и Шванновских клеток.

В аутоиммунной демиелинизации при РС и ЕАЕ принимают участие Т- и В-лимфоциты, а также другие клетки иммунной системы. Основную роль в разрушении миелиновых волокон и координации аутоиммунной атаки на ЦНС отводят CD4+ Т-лимфоцитам (Т-хелперам) подтипов Th1 и Th17. Однако результаты исследований последнего десятилетия однозначно свидетельствуют о том, что цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты (CTL) также играют важную роль в патогенезе РС и ЕАЕ.

Для того, чтобы специфичные к определенному антигену CD8+ цитотоксические лимфоциты могли лизировать таргетную клетку, они должны распознать антигенные пептиды, презентированные на поверхности атакуемой клетки на молекулах главного

комплекса гистосовместимости первого класса (МНС I). Антигенные пептиды образуются из внутриклеточных белков под действием антипода рибосомы – так называемой 26S протеасомы – мультисубъединичного белкового комплекса, обладающего протеолитической активностью. Большинство белков распознается и гидролизуется протеасомой только в форме ковалентного конъюгата с цепью молекул убиквитина. Для маркирования белков, предназначенных для деградации протеасомой, в клетке существует трехступенчатая система ферментов – убиквитин-лигаз. Пептиды, полученные в результате протеолиза внутриклеточных белков протеасомой, транспортируются в просвет эндоплазматического ретикулума. Там они загружаются на молекулы главного комплекса гистосовместимости первого типа и затем экспонируются на поверхности клетки, образуя своеобразный молекулярный паспорт клетки.

В настоящее время становится понятным, что молекулярные механизмы деградации аутоантигенов и их презентация тесно связана с развитием РС. Данная диссертационная работа посвящена механизмам деградации основного белка миелина протеасомой и презентации образующихся пептидов на молекулах МНС I как одного из этапов патогенеза РС.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Протеасома

Структура и каталитические свойства протеасомы

Протеасома – многосубъединичный белковый комплекс, обладающий протеолитической активностью. Он присутствует в ядрах и цитоплазме клеток некоторых прокариот и всех эукариот. Протеасомой названы два типа частиц разного строения, отличающихся молекулярной массой и коэффициентом седиментации. 20S протеасома с молекулярной массой 700 кДа и коэффициентом седиментации 20S в качестве протеолитического ядра входит в состав более сложной частицы – 26S протеасомы (**Рис. 1**).

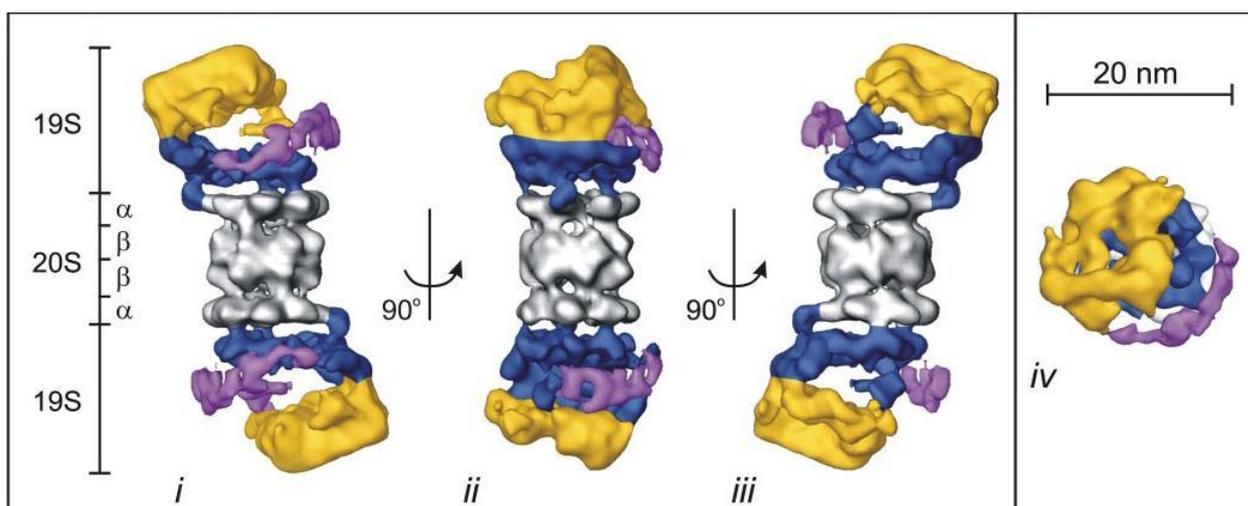


Рисунок 1. Структура 26S протеасомы человека. Серым цветом обозначено 20S ядро, синим и фиолетовым – нижний (базовый) элемент 19S регулятора, желтым – верхний элемент 19S регулятора [1].

По данным рентгеноструктурного анализа, 20S протеасома представляет собой полый цилиндр длиной 15-17 нм и диаметром 11-12 нм, состоящий из четырех лежащих друг на друге колец, причем два одинаковых периферических кольца сформированы субъединицами α -типа, а два одинаковых центральных кольца – субъединицами β -типа (**Рис. 2**). Каждое из колец состоит из 7 субъединиц, массой 20-35 кДа каждая. Канал внутри цилиндра, расширяясь, образует три камеры: большую центральную, в которой осуществляется протеолиз, и две меньшие камеры по краям [2].

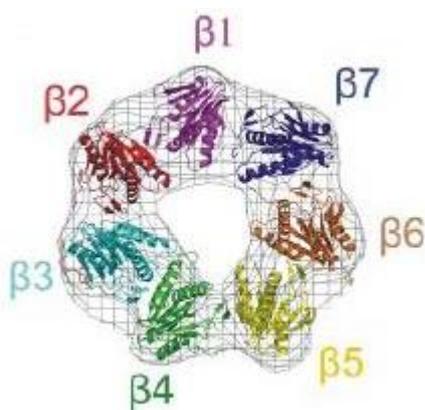
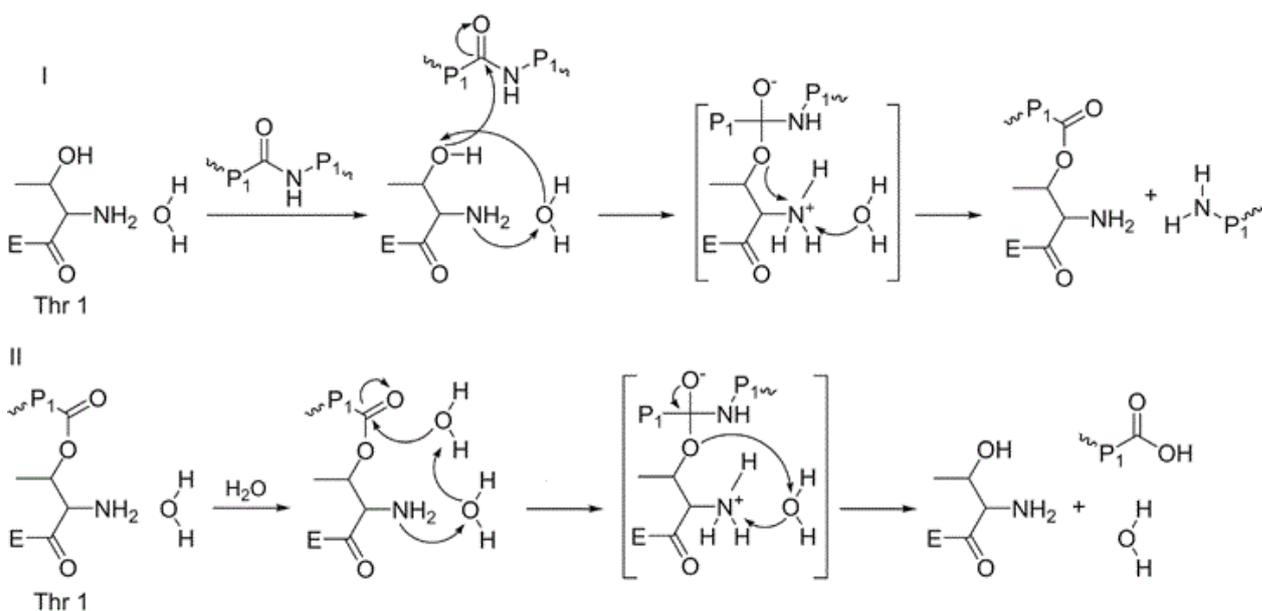


Рисунок 2. β -субъединицы в структуре протеасомы, вид по оси цилиндра [1].

Три из β -субъединиц ($\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$) ответственны за каталитическую активность, на каждой из них локализовано по одному каталитическому центру, а N-концевые остатки треонина этих субъединиц действуют как нуклеофилы [3].



Строение каталитических центров было установлено методами рентгеноструктурного анализа, а каталитически важный остаток – методом мутагенеза [4]. В ходе реакции протон гидроксильной группы триптофана переносится на аминогруппу этой же аминокислоты, а молекула воды в активном центре действует как основание. По подобному механизму работают еще три других фермента: пенициллинацилаза (в активном центре N-концевой серин), глутамин-амидотрансфераза (в активном центре N-концевой цистеин), аспартилглюкозаминидаза (в активном центре N-концевой треонин). В эукариотической протеасоме 4 из 7 β -субъединиц содержат N-концевой треонин. Кроме того, есть предположения, что аминокислотные остатки Lys³³ и Glu¹⁷ также находятся в

активном центре и участвуют в катализе. α -субъединицы не имеют каталитической активности, но важны для поддержания структуры протеасомы. При диссоциации на субъединицы каталитическая активность утрачивается полностью, что указывает на важную роль взаимодействий между субъединицами.

Протеасома обладает широкой субстратной специфичностью. Наибольшее влияние на кинетические параметры протеолиза оказывает аминокислотный остаток в положении P1. Выделяют 3 основных типа протеолитической активности протеасомы: активность по типу трипсина (расщепление полипептидной цепи после положительно заряженных аминокислотных остатков), активность по типу химотрипсина (после ароматических аминокислотных остатков), активность по типу каспазы (после отрицательно заряженных аминокислотных остатков) [5]. Протеолиз по типу каспазы осуществляется, в основном, β 1 субъединицей, по типу трипсина – β 2 субъединицей, по типу химотрипсина – β 5 субъединицей [6]. Помимо основных типов активности, протеасома обладает еще и несколькими дополнительными и способна расщеплять полипептидную цепь практически между любыми аминокислотными остатками. Кроме того, на связывание с активными центрами каталитических субъединиц и эффективность расщепления той или иной пептидной связи влияет не только аминокислотный остаток в P1-позиции, но и аминокислотные остатки в P2, P3 и P4 позициях [7-9].

Для протеолиза белка скорость-лимитирующей является химотрипсин-подобная активность протеасомы. Ингибирование или инактивация методом мутагенеза трипсин- и каспазо-подобной активности оказывают гораздо меньшее влияние на скорость гидролиза полипептидной цепи. Поскольку все три каталитические субъединицы являются частью единого комплекса, они аллостерически влияют на активность друг друга. Связывание субстрата химотрипсин-подобной активности увеличивает каспазоподобную активность, а связывание субстрата каспазоподобной активности ингибирует химотрипсин-подобную активность. Предполагают, что при гидролизе полипептидной цепи сначала активируется химотрипсин-подобный сайт, который расщепляет ее на пептидные фрагменты, затем этот химотрипсин-подобный сайт аллостерически инактивируется и каспазоподобный сайт расщепляет образовавшиеся на первой стадии пептиды на более мелкие фрагменты, после чего активные центры освобождаются и цикл повторяется [10].

В норме 20S протеасома существует в неактивном состоянии, так как α -субъединицы за счет своих N-концевых гидрофобных участков блокируют вход в каталитическую полость, препятствуя случайному протеолизу. Скорость гидролиза пептидов существенно увеличивается при открытии входов в каталитическую полость. Они открываются при связывании с регуляторными белковыми комплексами: 19S регуляторным комплексом и

активатором PA28, при наличии определенных мутаций в структурных субъединицах [11], и при обработке некоторыми химическими соединениями, например SDS в низких концентрациях [12]. Однако даже в присутствии регуляторных комплексов белковые субстраты должны находиться в растянутой или развернутой конформации, чтобы попасть в каталитическую полость [13].

Регулятор PA28 – гептамерный комплекс массой 180-200 кДа, состоит из IFN γ -индуцибельных α и β -субъединиц. Он способен присоединяться к обоим концам протеолитического ядра или замещать 19S регулятор в 26S протеасоме. Существует гибридная протеасома, к которой с одного конца присоединен PA28, а с другого – 19S регулятор. PA28 связывается с 20S протеасомой обратимо, для этого процесса не требуется АТФ [14]. При этом открывается канал, ведущий в каталитическую полость протеасомы, что в несколько раз увеличивает ее активность [15].

20S каталитическое ядро, связанное с двумя регуляторами PA700 с обоих концов цилиндра, представляет собой 26S протеасому. Ее молекулярная масса составляет более 2500 кДа. При связывании каталитического ядра с PA700 становится возможным гидролиз крупных полипептидов и белков. Для сборки 26S протеасомы из 20S и регуляторного комплекса необходимо присутствие АТФ. Доля частиц 20S, присоединивших PA700, растет при увеличении концентрации АТФ, и достигает максимума при 10 мкМ АТФ. При дальнейшем увеличении концентрации АТФ она не меняется [16]. Регулятор PA700 при присоединении к 20S протеасоме влияет на параметры канала, ведущего в каталитическую полость, таким образом, что туда могут проникнуть крупные молекулы. Методом электронной микроскопии установлено, что в структуре 26S протеасомы α -субъединицы радиально смещаются по направлению от центра по сравнению с 20S протеасомой [1].

подавляющее большинство белков разрушаются 26S протеасомой по убиквитин-зависимому пути. Для распознавания протеасомой белок, который необходимо разрушить, должен быть связан с цепочкой из не менее чем четырех молекул убиквитина – полипептида, содержащего 76 аминокислотных остатков. Регулятор PA700 (называемый также 19S регуляторным комплексом и μ -частицей) имеет большую молекулярную массу и сложную структуру, состоит из 19 различающихся между собой белковых субъединиц (**Рис. 3**). В его структуре можно выделить два основных элемента: нижний (базовый) элемент состоит из шести отличающихся по структуре субъединиц, имеющих АТФазную активность (Rpt1-6), структурных субъединиц Rpn1 и Rpn2 и двух убиквитин-связывающих субъединиц Rpn10 и Rpn13. PA700 присоединяется непосредственно к α -кольцу каталитического ядра и обеспечивает разворачивание полипептидной цепи

белковых субстратов [13]. Энергия гидролиза АТФ расходуется на разворачивание полипептидной цепи белкового субстрата и транслокацию ее в каталитическую полость. Верхний элемент состоит из 9 не-АТФазных субъединиц: Rpn3, 5–9, 11–12 (Рис. 3). Rpn11 осуществляет деубиквитинирование субстрата [17].

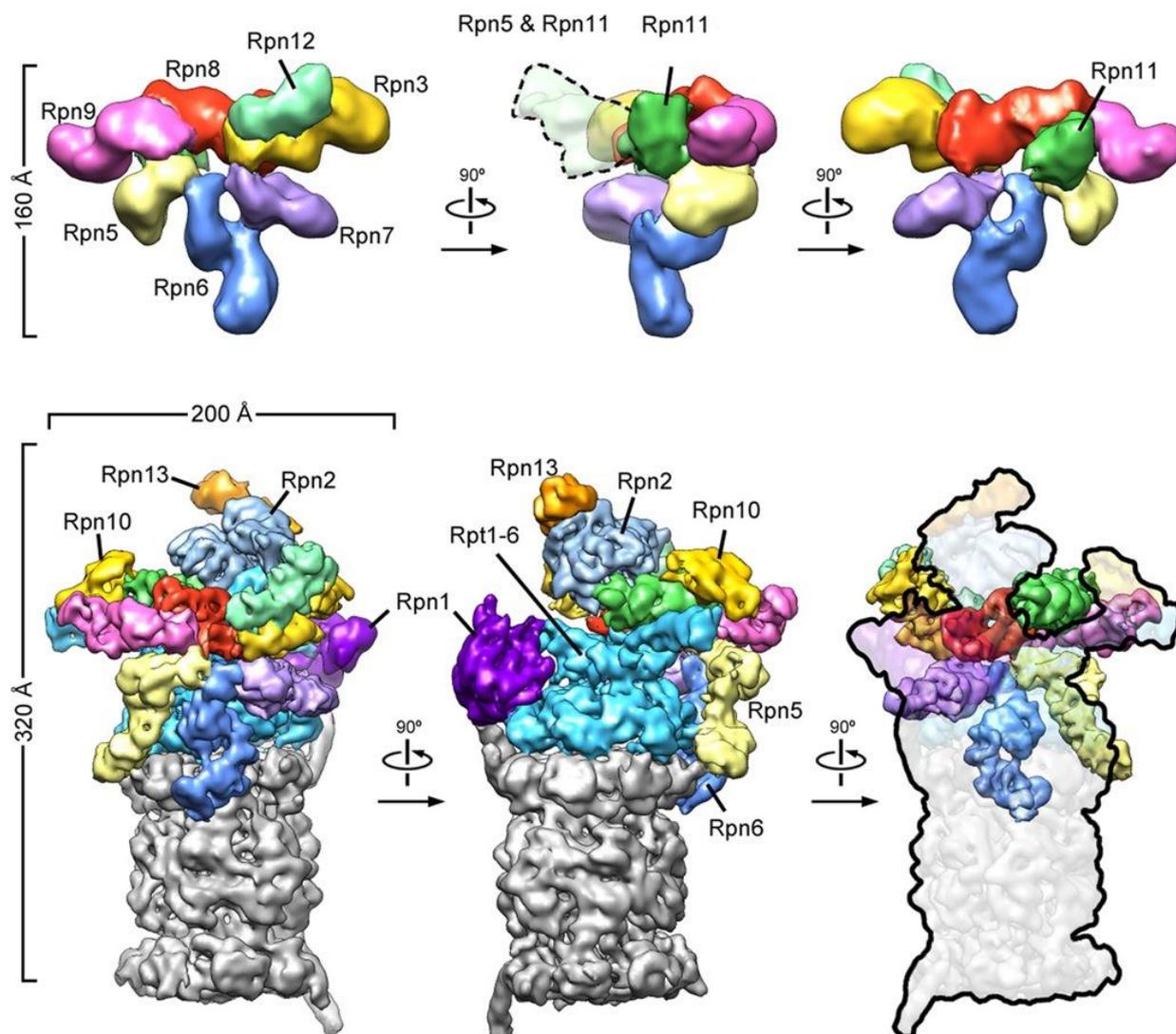


Рисунок 3. Структура 19S регулятора. Серым цветом обозначена 20S субчастица. Адаптировано из [17].

Сборка протеасомы из субъединиц – сложный многостадийный процесс. β -субъединицы в клетке синтезируются в виде неактивных предшественников, удлинённых с N-конца по сравнению со зрелыми β -субъединицами. N-концевые пептиды являются сигналами для белковых факторов, участвующих в сборке протеасомы, а также предотвращают преждевременную активацию β -субъединиц. При сборке сначала формируются относительно стабильные интермедиаты – «пре-протеасомы», состоящие из одного α -кольца, частично собранного кольца из β -предшественников и вспомогательных факторов. Затем два интермедиата объединяются, формируя 20S протеасому. При этом N-

концевые пропептиды отщепляются по аутокаталитическому механизму, высвобождая остатки треонина каталитических центров [18].

Основными функциями протеасомы являются: деградация отслуживших и дефектных (например, окисленных или неправильно фолдированных) белков; участие в регуляции клеточного цикла – процессинг белков, регулирующих клеточный цикл; процессинг регуляторных белков и транскрипционных факторов; участие в работе иммунной системы – гидролиз клеточных белков до антигенных пептидов, презентующихся на поверхности клетки на молекулах МНС I; участие в процессе апоптоза.

Иммунопротеасома

В организме животных, имеющих иммунную систему, содержится два типа протеасомы – стандартная протеасома и иммунопротеасома. Под действием провоспалительных цитокинов – $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ – в клетках начинается синтез каталитических иммуносубъединиц LMP2 ($\beta 1i$), MEC1-1 ($\beta 2i$) и LMP7 ($\beta 5i$). Они гомологичны конститутивным субъединицам $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$, соответственно, и благодаря усиленной экспрессии встраиваются во вновь собирающиеся частицы протеасомы вместо конститутивных субъединиц. В профессиональных антиген-презентирующих клетках иммуносубъединицы экспрессируются постоянно. Иммунопротеасома отличается от конститутивной по субстратной специфичности и поэтому более эффективно генерирует большинство антигенных пептидов [19], презентующихся на МНС I.

Сборка иммунопротеасомы из субъединиц происходит в 3-4 раза быстрее, чем стандартной протеасомы. Предполагают, что в этом процессе ключевую роль играет специальный $IFN\gamma$ -индуцибельный белок – фактор созревания протеасомы (proteasome maturation protein, POMP) [20]. Кроме того, разрушение иммунопротеасомы также происходит намного быстрее, чем конститутивной протеасомы, ее период полураспада в клетке составляет всего 120 часов. Такой быстрый круговорот иммунопротеасомы позволяет клеткам быстро включаться в иммунный ответ и возвращаться в нормальное состояние, как только функционирование иммунопротеасомы перестанет быть необходимым.

Из-за отличий в строении каталитических субъединиц конститутивная и иммунопротеасома отличаются по субстратной специфичности (**Рис. 4**). Иммунопротеасома обладает повышенной активностью по типу химотрипсина и пониженной активностью по типу трипсина и каспазы по сравнению с конститутивной протеасомой. Каталитическая иммуносубъединица $\beta 1i$ замещает субъединицу $\beta 1$, однако

методами ингибиторного анализа установлено, что $\beta 1i$ субъединица обуславливает, как минимум частично, специфичность по типу химотрипсина [21].

Недавно проведенный рентгеноструктурный анализ конститутивной и иммуно- 20S протеасомы мыши [22] показал, что в случае $\beta 2$ -субъединицы ее область, связывающая субстрат, по структуре практически идентична у $\beta 2i$ и $\beta 2$ субъединиц как в свободной конформации, так и в конформации, принимаемой при связывании с субстратом. Единственное структурное отличие $\beta 2i$ и $\beta 2$ субъединиц состоит в замещении Asp53 ($\beta 2$) на Glu ($\beta 2i$), что очень незначительно влияет на ее структуру и каталитические свойства. Поскольку замещение $\beta 2$ на $\beta 2i$ не влияет на субстратную специфичность протеасомы, причина и функциональная роль замещения $\beta 2$ на $\beta 2i$ пока остаются невыясненными.

При сравнении структуры активных центров $\beta 1$ и $\beta 1i$ субъединиц наблюдаются замены T20V, T31F, R45L, и T52A, которые увеличивают гидрофобность и уменьшают размер S1-области (связывающей P1-аминокислотный остаток субстрата). Следовательно, $\beta 1i$ субъединица гидролизует субстрат в основном после небольших гидрофобных аминокислот и поэтому генерирует больше презентующихся на МНС I пептидных эпитопов, содержащих неполярные аминокислоты (валин, лейцин, изолейцин) на С-конце [22].

В каталитических центрах $\beta 5$ и $\beta 5i$ субъединиц, аминокислотные остатки, обуславливающие химотрипсин-подобную специфичность, Ala20, Met45, Ala49 и Cys52, не отличаются друг от друга. Единственное различие состоит в замене Ala27 ($\beta 5$) на Ser ($\beta 5i$), что уменьшает размер S1 и S3 областей и придает им более гидрофильный характер. Повышенная полярность обуславливает увеличение скорости гидролиза пептидной связи, привлекая в активный центр больше молекул воды. Кроме того, конформация активного центра $\beta 5i$ иммуносубъединицы стабилизирует тетраэдрическое переходное состояние в реакции гидролиза пептидной связи, что также увеличивает ее протеолитическую активность [22].

Различия в структуре конститутивных и иммуносубъединиц протеасомы позволяют создавать ингибиторы, селективно блокирующие определенную субъединицу.

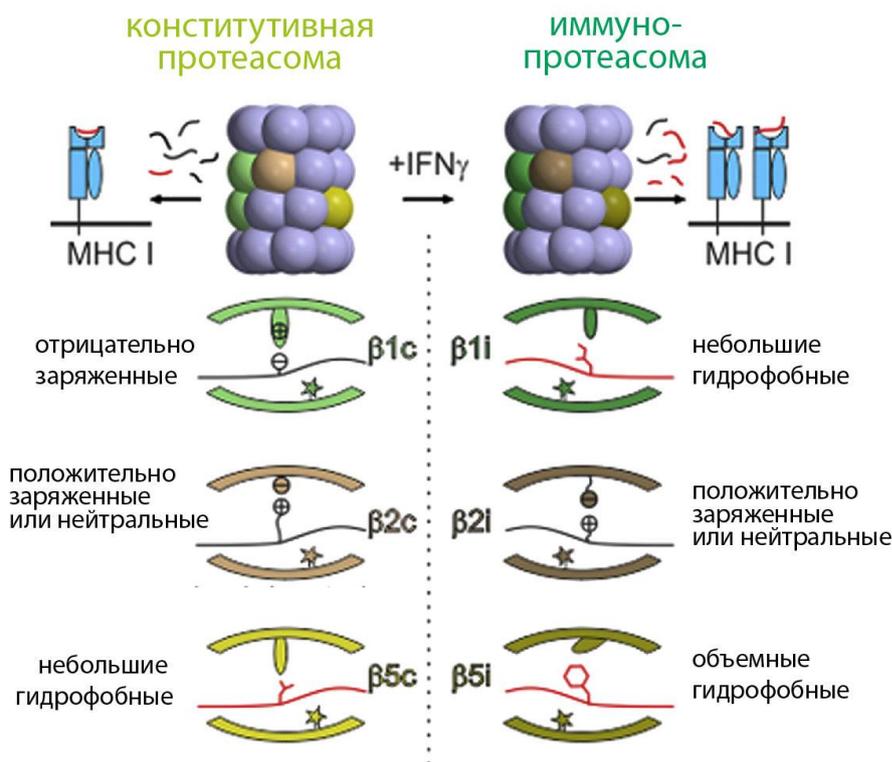


Рисунок 4. Различия в субстратной специфичности конститутивной и иммунопротеасомы по P1-аминокислотным остаткам. Адаптировано из [22].

Поскольку наличие С-концевого гидрофобного остатка в полипептиде является важным фактором, обеспечивающим связывание с молекулами МНС класса I, можно предположить, что антигенные пептиды производятся главным образом иммунопротеасомой, и клетки, содержащие этот тип протеасомы, представляют антиген на своей поверхности более эффективно. Это подтверждается многочисленными экспериментами: при расщеплении белков иммунопротеасомой образуется значительно большее количество пептидов, С-конец которых соответствует иммуногенным фрагментам, чем при расщеплении тех же белков стандартной протеасомой [19, 23]. У мышей, нокаутных по $\beta 1i$, наблюдается существенное изменение репертуара цитотоксических Т-лимфоцитов, распознающих антигенные пептиды в комплексе с МНС I [24]. У мышей, нокаутных по $\beta 5i$, в отличие от нокаутных по $\beta 1i$ или $\beta 2i$, на 50% уменьшается количество молекул МНС I [25], и они более подвержены развитию инфекционных заболеваний [26].

В работе [27] было показано, что существуют антигенные пептиды, которые намного лучше производятся стандартной протеасомой, чем иммунопротеасомой. Некоторые антигенные пептиды содержат в своей последовательности гидрофобные остатки, и поэтому они разрушаются иммунопротеасомой, которая имеет высокую активность по типу химотрипсина и расщепляет такие пептиды после гидрофобных остатков. При этом такие пептиды достаточно эффективно производятся стандартной протеасомой и

представляются на поверхности клеток в комплексе с молекулами МНС I. И наоборот, антигенные пептиды, содержащие кислые аминокислотные остатки, разрушаются стандартной протеасомой, которая расщепляет их после кислого остатка, но эффективно производятся иммунопротеасомой [28].

Недавно был обнаружен новый тип протеасомы, названный тимопротеасома [29]. Она содержит субъединицу особого типа, по структуре наиболее близкую к $\beta 5$ и $\beta 5i$. Эта субъединица названа $\beta 5t$, она экспрессируется только в эпителиальных клетках коры тимуса, где она встраивается в протеасому вместо $\beta 5$ или $\beta 5i$. Другие две каталитические субъединицы тимопротеасомы являются иммуносубъединицами. У тимопротеасомы практически отсутствует химотрипсин-подобная активность. Поэтому на молекулах МНС эпителиальных клеток коры тимуса презентруется уникальный набор пептидов, что имеет большое значение для положительной селекции Т-клеток, происходящей в тимусе [30].

Система убиквитинилирования. Убиквитин-зависимый и убиквитин-независимый протеолиз

Около половины всех клеточных белков подвергается гидролизу протеасомой. Однако, прежде чем начнется этот процесс, она должна распознать объект протеолиза по какому-то признаку. Маркировкой клеточных белков занимается специальная система ферментов – система убиквитинилирования. Деградация белков по убиквитин-зависимому пути включает две последовательные стадии: 1) маркировка субстрата путем ковалентного связывания цепи из молекул убиквитина 2) деградация маркированных белков 26S протеасомой и высвобождение убиквитина, пригодного для дальнейшего использования [31].

Система убиквитинилирования, включающая три типа ферментов (E1, E2 и E3), высокоспецифична и избирательна за счет построения по принципу иерархического усложнения (**Рис. 5**). Фермент E1 (может быть двух типов, Ube1 или Ube1-L2) присоединяет убиквитин, активируя его. Затем активированный убиквитин переносится на убиквитин-конъюгирующий белок E2 (ubiquitin-conjugating enzymes, UBCs). В геноме млекопитающих закодировано около 30 различных ферментов E2. После этого убиквитин переносится на целевой белок с участием убиквитин-лигазы E3. В клетках млекопитающих содержится более 600 белков и мультимерных комплексов, обладающих активностью E3. Убиквитин может связываться с белком-субстратом или через его N-конец, или изопептидной связью через аминогруппу остатка лизина. Иногда убиквитин может связываться с белками также через остатки цистеина, серина или треонина.

Убиквитин связывается с белками или в виде мономера, или в виде полиубиквитиновой цепи, которая формируется через внутренние остатки лизина. В молекуле убиквитина содержится 7 остатков лизина, наиболее типично формирование полиубиквитиновой цепи через образование изопептидной связи между остатком лизина-48 и С-концевым остатком глицина-76, хотя протеасома способна распознавать и другие варианты полиубиквитиновых цепей. Недавно был обнаружен еще один фермент системы убиквитинилирования, E4, который участвует в элонгации коротких полиубиквитиновых цепей, но полиубиквитинилирование большинства белковых субстратов может протекать и без его участия [32]. Кроме маркирования белков, которые должны быть разрушены, убиквитинилирование может также служить другим целям, таким как регуляция активности ферментов или факторов транскрипции. Полиубиквитиновая цепь связывается с субъединицами протеасомы Rpn10 или Rpn13 [33]. Убиквитин удаляется с белков деубиквитинилирующими ферментами – убиквитин-изопептидазами и может быть использован для следующего цикла убиквитинилирования [34]. Известны случаи, когда убиквитин протеолизуется вместе с субстратом [35].

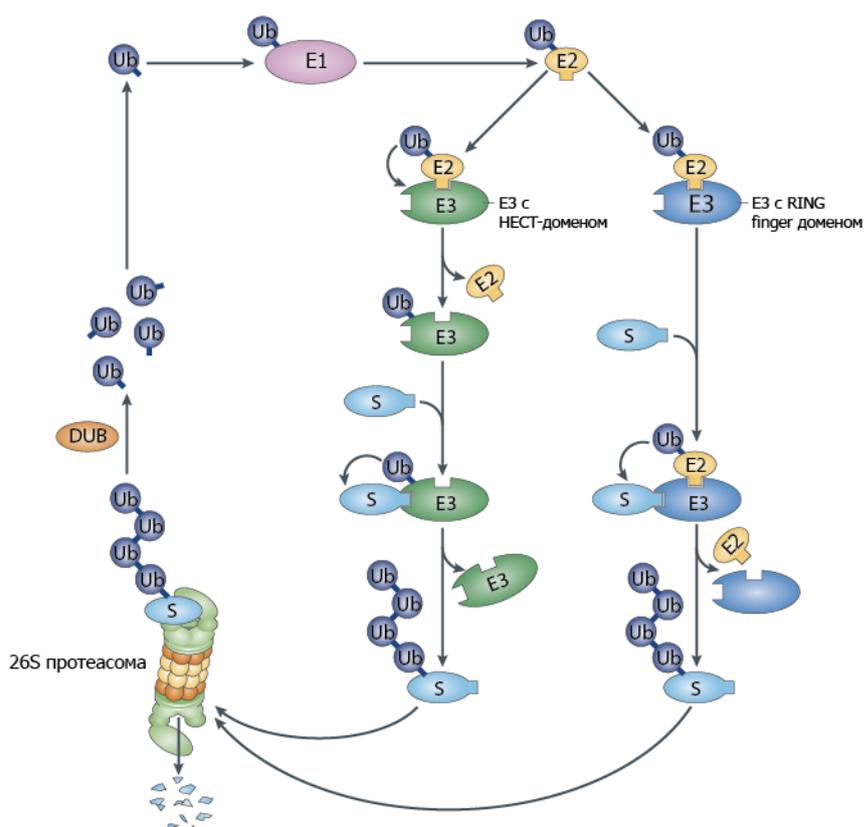


Рисунок 5. Схема процесса убиквитин-зависимой деградации белков протеасомой. Адаптировано из [36]

Для гидролиза субстрата протеасомой, необходимо, во-первых, наличие детерминанты, обуславливающей связывание 19S субчастицей протеасомы, и, во-вторых,

наличие в белке неструктурированной области, с которой начинается расплетание полипептидной цепи и транслокация ее в каталитическую полость протеасомы [37]. До недавнего времени считалось, что для распознавания субстрата протеасомой он должен быть промаркирован цепью из как минимум четырех молекул убиквитина [38], а обнаруживаемые в клетке моноубиквитинилируемые белки участвуют в не-протеолитических процессах, таких как мембранный транспорт и регуляция транскрипции. Но в последнее время стали появляться исследования, демонстрирующие, что для гидролиза протеасомой в некоторых случаях достаточно моноубиквитинилирования или множественного моноубиквитинилирования нескольких сайтов одной белковой молекулы. Например, PAX3, регулятор дифференциации мышечных клеток, протеолизуется после моноубиквитинилирования одного определенного остатка лизина [39]. Моноубиквитинилирование цитоплазматического домена белка SDC4, рецептора клеточной адгезии, также приводит к деградации этого белка протеасомой. Для расщепления протеасомой p105, предшественника фактора транскрипции NF-κB, до активного фактора транскрипции, p50, необходимо моноубиквитинилирование нескольких остатков лизина в составе этой молекулы [40]. Множественное моноубиквитинилирование приводит к протеолизу также в случае фосфолипазы D (PLD) и циклина B1. Путем экспериментов как на природных белках, так и на полипептидах с искусственно созданными аминокислотными последовательностями, показано, что в общем случае для деградации полипептидных цепей длиной от 20 до 150 аминокислот достаточно моноубиквитинилирования, а белки размером больше 150 аминокислот, как правило, гидролизуются протеасомой при конъюгации с полиубиквитиновой цепью [41].

Тем не менее, существуют белки, для гидролиза которых протеасомой не нужно ни моно-, ни полиубиквитинилирование. Одним из наиболее изученных убиквитин-независимых субстратов 26S протеасомы является орнитиндекарбоксилаза (ODC). 37 С-концевых аминокислотных остатков этого фермента обуславливают его ассоциацию с протеасомой, а также содержат структурно неупорядоченную область, с которой начинается транслокация полипептидной цепи в каталитическую полость протеасомы. При удалении С-концевого домена ODC перестает гидролизироваться протеасомой. И наоборот, если создать химерный белок, состоящий из 37 С-концевых аминокислотных остатков ODC и какого-либо белка, не являющегося убиквитин-независимым субстратом, например GFP, то такой белок будет протеолизироваться убиквитин-независимо [42]. Протеолиз ODC существенно ускоряется при связывании со вспомогательным белком – антизимом-1, при связывании с которым С-конец ODC становится более стерически

доступным. При этом антизим не протеолизуется вместе с ODC. Убиквитин-подобный белок FAT10 также может гидролизироваться протеасомой убиквитин-независимо благодаря его способности взаимодействовать с VWA-доменом убиквитин-связывающей субъединицы протеасомы Rpn10.

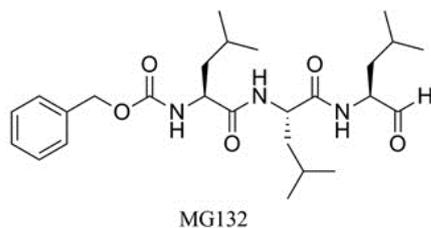
Многие структурно неупорядоченные белки или белки, имеющие достаточно крупные неупорядоченные сегменты, могут гидролизироваться 20S протеасомой без убиквитинилирования. Примерами таких белков могут служить α -синуклеин, I κ B α , факторы супрессии опухолей p53 и p73, ингибитор циклин-зависимой киназы p21. Протеолиз некоторых из этих белков, например факторов супрессии опухолей p53 и p73 α , регулируется NADH-зависимым ферментом NQO1, который связывается с данными белками и защищает их от действия 20S протеасомы [43]. Протеолиз других подобных субстратов блокируется так называемыми panny proteins – белками, специфически связывающими структурно неупорядоченные области вновь синтезируемых белков. В случае p53 роль panny protein выполняет белок Hdmx, в случае I κ B α – NF κ B. Еще один пример – активатор транскрипции AP1, который является гетеродимером, состоящим из белков cFos и cJun. cFos имеет несколько структурно неупорядоченных областей, и в свободном виде подвергается гидролизу 20S протеасомой [44].

Ингибиторы протеасомы

Пептидазная активность протеасомы по одному или сразу нескольким типам может быть заблокирована низкомолекулярными ингибиторами. Большинство известных ингибиторов направлены на химотрипсин-подобную активность, но существуют селективные ингибиторы трипсино- и каспазоподобной активности.

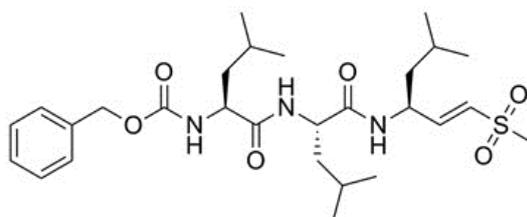
Существует несколько различных классов ингибиторов протеасомы.

1) Альдегидные производные пептидов – конкурентные обратимые ингибиторы. Такие соединения легко синтезировать и они эффективно проникают в клетку, однако они не очень специфичны и помимо протеасомы ингибируют также некоторые протеазы, например кальпаин и некоторые катепсины. Наиболее часто применяемыми ингибиторами этой группы являются MG-132 (Z-LLL-CHO) и PSI (Cbz-Ile-Glu(O-tBu)-Ala-Leu-CHO). MG-132 в концентрациях 50-100 мкМ ингибирует все три типа активности протеасомы, а в концентрациях на два порядка ниже – ингибирует только химотрипсин-подобную активность, не воздействуя при этом на другие типы активности.



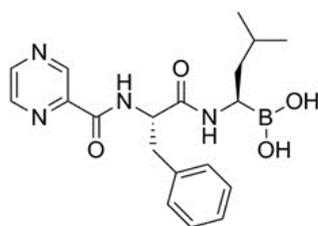
Изменяя аминокислотный состав пептида, можно получить селективные ингибиторы каспазоподобной активности, например содержащие аспарагиновую кислоту в P1-позиции Ac-Ala-Pro-Nle-Asp-al, Z- Pro-Nle-Asp-al [45].

2) Винилсульфоновые производные пептидов. Известно, что винилсульфон может связывать тиольную группу в активном центре цистеиновых протеаз. Винилсульфоновая группа, соединенная с подходящим пептидом, может специфично и необратимо связывать треонин в активном центре протеасомы. Примером ингибиторов этого класса является Z-Leu-Leu-Leu-VS, в концентрациях 1-5 мкМ связывающийся преимущественно с субъединицей $\beta 5$ [46].



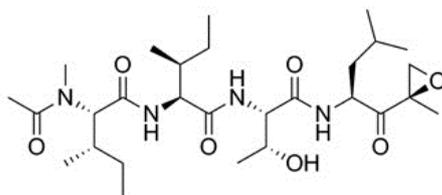
Z-Leu-Leu-Leu-VS

3) Пептидные производные борной кислоты. Медленно связывающиеся обратимые ингибиторы с малой скоростью диссоциации. Их преимущество перед другими типами ингибиторов – малый размер молекулы, всего два аминокислотных остатка, что обуславливает хорошую растворимость и способность проходить через клеточные мембраны. К этому типу ингибиторов относится PS-341 (бортезомиб) – препарат, используемый в терапии множественной миеломы. В наномолярных концентрациях специфично ингибирует химотрипсин-подобную активность *in vitro* и *in vivo*. Раковые клетки более чувствительны к остановке клеточного цикла, вызываемой ингибированием протеасомы, что обуславливает эффективность бортезомиба в терапии множественной миеломы.



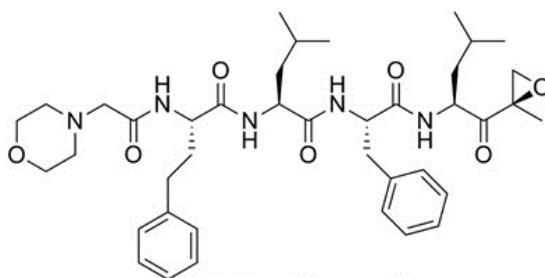
PS-341

4) Эпоксикетон-производные пептидов. Ковалентно и необратимо связываются с протеасомой, образуя морфолиновое кольцо при взаимодействии с N-концевой аминогруппой в активном центре каталитических субъединиц протеасомы. В лабораторной практике широко применяется эпоксимицин (Ас-Пе-Пе-Тр-Леу-эпоксикетон) который в концентрации <100 нМ связывает все каталитические субъединицы протеасомы.



MG-132

Еще один ингибитор этого класса, CFZ (карфилзомиб), связывающий $\beta 5$ и $\beta 5i$ в наномолярных концентрациях, также применяется в терапии множественной миеломы [47].

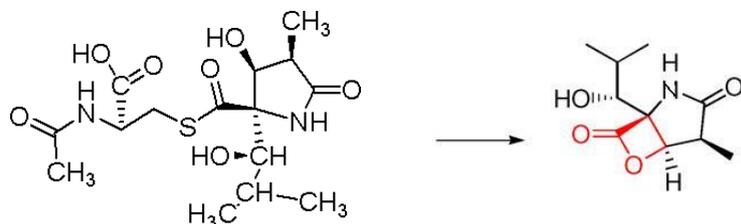


Карфилзомиб

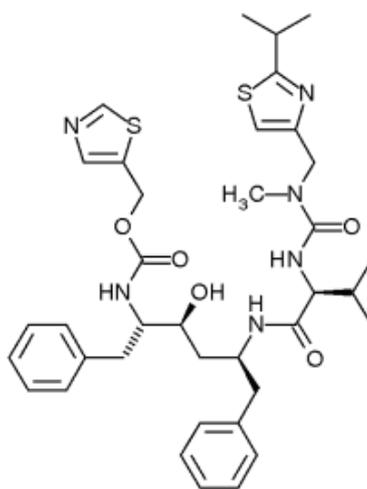
5) Производные лактонов. Блокируют в основном активность по типу химотрипсина, при этом лактонное кольцо необратимо ацилирует треонин в активном центре. Некоторые из этих соединений, например лактацистин, для активации требуют перестройки структуры в активный β -лактон. На практике такая перестройка происходит в водном растворе после 1

часа инкубации при 37°C. Активация лактацистина происходит с отщеплением N-ацетилцистеина [48].

Лактацистин воздействует в основном на химотрипсин-подобную активность с $IC_{50}=70$ нМ, IC_{50} для активностей других типов приблизительно в 100 раз выше.



б) Ингибитор смешанного действия – ритонавир. Ритонавир является ингибитором аспартильной протеазы ВИЧ, но в микромолярных концентрациях также обратимо конкурентно ингибирует протеасому, снижая ее активность по типу химотрипсина, но повышая активность по типу трипсина. Взаимодействует как с активными центрами каталитических субъединиц, так и с некаталитическим сайтом, осуществляя аллостерическую модуляцию активности протеасомы [49].



Ритонавир

7) Неконкурентные ингибиторы. Соединения этой группы не взаимодействуют с активным центром. Являясь аллостерическими регуляторами, они взаимодействуют с некаталитическими частями протеасомы, изменяя ее активность. Наиболее хорошо изучен механизм действия PR-пептидов. Пептид, богатый пролином и аргинином, состоящий из 39 аминокислотных остатков, и его N-концевой фрагмент из 11 аминокислотных остатков

взаимодействуют с $\alpha 7$ субъединицей 20S протеасомы, и из-за этого меняются параметры канала, ведущего к каталитическим центрам протеасомы [50].

Как уже упоминалось ранее, субъединицы $\beta 1$ и $\beta 1i$, а также $\beta 2$ и $\beta 5i$ отличаются друг от друга по структуре активного центра. Это делает возможным создание ингибиторов, селективно воздействующих на иммуносубъединицы протеасомы. К $\beta 1i$ -специфическим ингибиторам относятся пептидилэпоксикетон UK-101 [21], пептидилальдегид IPSI-001 (Z-LnL-CHO) [51], пептидилэпоксикетон YU-102 [52]. $\beta 5i$ -специфическими ингибиторами являются пептидилэпоксикетон PR-924 и пептидилэпоксикетон ONX0914 (PR-957) [53]. IC_{50} по отношению к индивидуальным субъединицам протеасомы для этих соединений приведены в **таблице 1**.

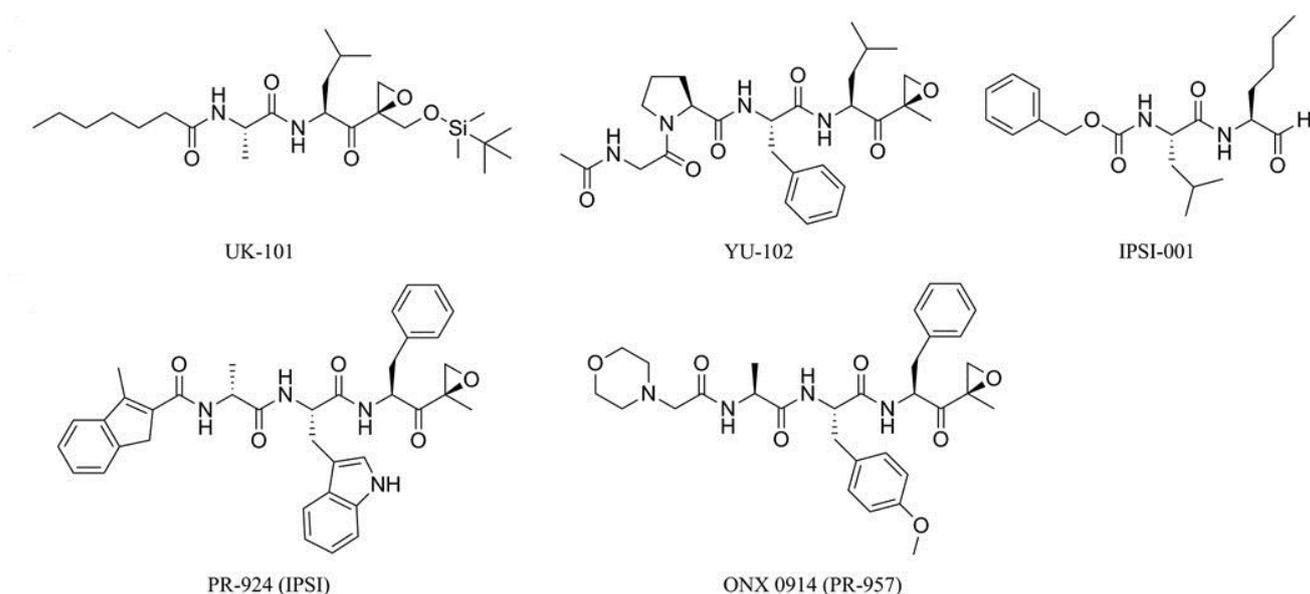


Таблица 1. IC_{50} селективных ингибиторов иммунопротеасомы [54]

Ингибитор		IC_{50} , мкМ	
		Конститутивная протеасома	Имунопротеасома
$\beta 1i$ - специфические	UK-101	14 (<i>ex vivo</i>)	2 (<i>ex vivo</i>)
	IPSI-001	1.03 ± 0.17 (химотрипсин-подобная активность)	105 ± 1.3 (химотрипсин-подобная активность)
	YU-102	0,209 ($\beta 1$), >5 ($\beta 2$), >1 ($\beta 5$)	0,046 ($\beta 1i$), >5 ($\beta 2i$ и $\beta 5i$)
$\beta 5i$ - специфические	PR-957	~0,5 ($\beta 5$)	~0,01 ($\beta 5i$)
	PR-924	2,9 ($\beta 5$)	0,022 ($\beta 5i$)

соответствующие вспомогательные молекулы должны прореагировать с комплексом МНС-антигенный пептид. Активированные CD4+ Т-клетки начинают вырабатывать цитокины, обладающие выраженным иммунорегуляторным эффектом. Активированные CD8+ Т-клетки уничтожают зараженные вирусами или трансформированные клетки [56]. На поверхности каждой клетки презентируется приблизительно 10000 различных пептидов, которые представляют практически все клеточные белки; каждому белку соответствует один или несколько пептидов [57].

Молекулы МНС II класса экспрессируются на поверхности клеток практически любого типа; тем не менее, процессинг и презентация антигена в разных типах клеток идут с заметно различающейся эффективностью. Это позволяет выделять несколько типов клеток: макрофаги, В-лимфоциты и дендритные клетки (DC), в особую группу – «профессиональные» антиген-презентирующие клетки (АПК) [58]. На молекулах МНС II класса презентируются внеклеточные антигены. Процессинг антигена начинается с эндоцитоза, в результате чего антиген оказывается заключенным в фаголизосомы и подвергается действию протеаз. Во внутреннем пространстве ЭПР формируются молекулы II класса МНС, которые защищены инвариантной цепью от случайного взаимодействия с пептидами. На следующем этапе происходит слияние фаголизосомы с пептидными фрагментами с вакуолью, содержащей комплекс молекула МНС II класса-инвариантная цепь. Фаголизосома содержит сериновые и аспарагиновые протеазы, называемые катепсинами. Они расщепляют инвариантную цепь, оставляя лишь CLIP-фрагмент (ClassII-associated Invariant chain Peptide), который занимает антиген-связывающий участок молекулы МНС; эти же протеазы расщепляют антиген до отдельных пептидов. Образовавшийся комплекс МНС II-антигенный пептид в составе секреторной гранулы перемещается к клеточной поверхности. Затем CLIP-фрагмент заменяется на антигенный пептид, и образовавшийся комплекс МНС II-антигенный пептид в составе секреторной гранулы перемещается к клеточной поверхности. (Рис. 6).

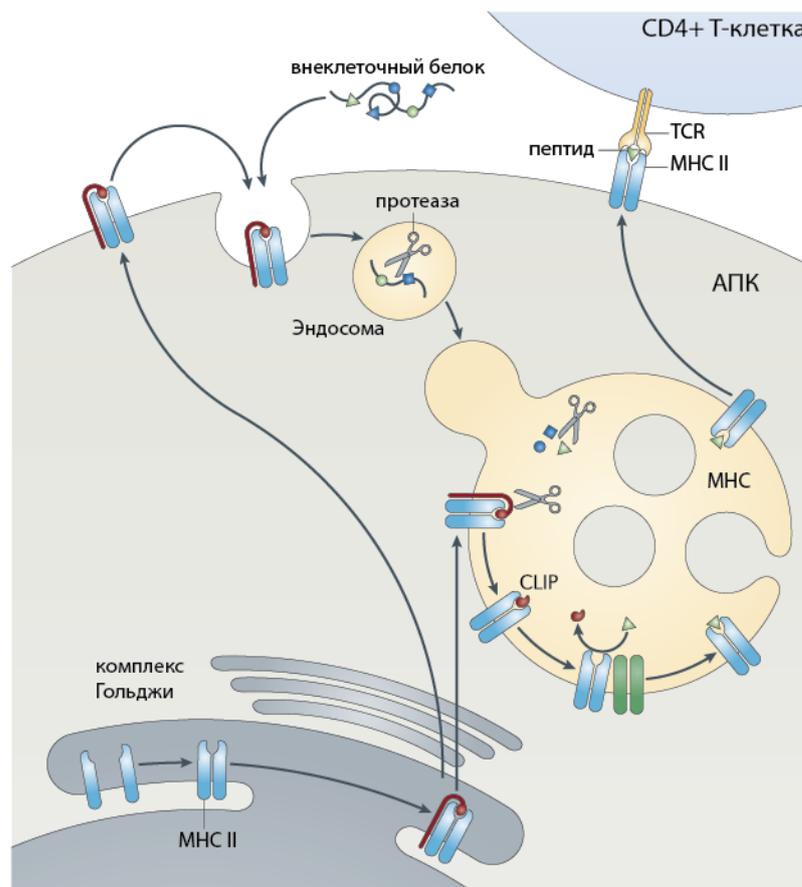


Рисунок 6. Процессинг внеклеточных антигенов и их презентация на МНС II. Адаптировано из [59].

Процессинг антигенов, презентующихся на молекулах МНС I класса.

В комплексе с молекулами МНС I класса, как правило, презентуются пептиды белков, синтезирующихся внутри клетки и локализующихся в цитозоле. В нормальной ситуации все презентуемые пептиды происходят из нормальных внутриклеточных белков и поэтому не узнаются Т-клетками. В патологических ситуациях, например при инфицировании клетки вирусом, на МНС I, помимо собственных, презентуются чужеродные пептиды. Чужеродные пептиды узнаются Т-лимфоцитами, что может привести к уничтожению такой клетки.

Процессинг антигенов начинается с убиквитинилирования антигенного белка и его фрагментации протеасомой, а также другими протеазами (**Рис. 7**). Образовавшиеся пептиды проникают во внутреннее пространство эндоплазматического ретикулума (ЭПР) с помощью белков ТАР1 и ТАР2 (transporter associated with antigen processing). Во внутреннем пространстве ЭПР пептиды могут подвергаться действию ферментов, которые отщепляют одну или несколько аминокислот с N-конца, после чего пептиды образуют комплекс с гетеродимерными молекулами МНС I класса. Ферменты с карбоксипептидазной активностью в просвете ЭПР отсутствуют. Молекула МНС и пептид

должны строго соответствовать друг другу по структуре, чтобы образовать комплекс, поэтому каждая конкретная молекула МНС может связать только пептид определенной аминокислотной последовательности. Длина презентруемого пептида составляет 8-11 аминокислотных остатков, что обусловлено пространственной структурой пептид-связывающего домена молекул МНС I класса. В ЭПР присутствует специальная аминопептидаза, называемая ERAPP, которая укорачивает поступающие в ЭПР пептиды до нужной длины; если для пептида сразу же не находится соответствующей ему молекулы МНС I – он разрушается этой пептидазой полностью [60]. Протеолиз пептидов в ЭПР имеет как минимум два отличия от протеолиза в цитозоле. Во-первых, в ЭПР осуществляется подбор пептидов, структурно соответствующих молекулам МНС, то есть N-концевой экзопротеолиз заканчивается, как только образуется пептид нужной длины и связывается с молекулой МНС, а в цитозоле вероятность своевременной остановки протеолиза и получения пептида правильной длины меньше. Во-вторых, протеолиз в просвете ЭПР компенсирует некоторые эффекты, связанные с неодинаковым сродством антигенных пептидов к ТАР. Известно, что наибольшим сродством к ТАР обладают пептиды, имеющие в позиции 2 остаток пролина. Поэтому отщепление N-конца после проникновения пептида в просвет ЭПР снимает противоречие между селективностью ТАР и селективностью молекул МНС I [61]. На заключительном этапе сформировавшийся комплекс пептид – молекула МНС I транспортируется через аппарат Гольджи к поверхности клетки [58].

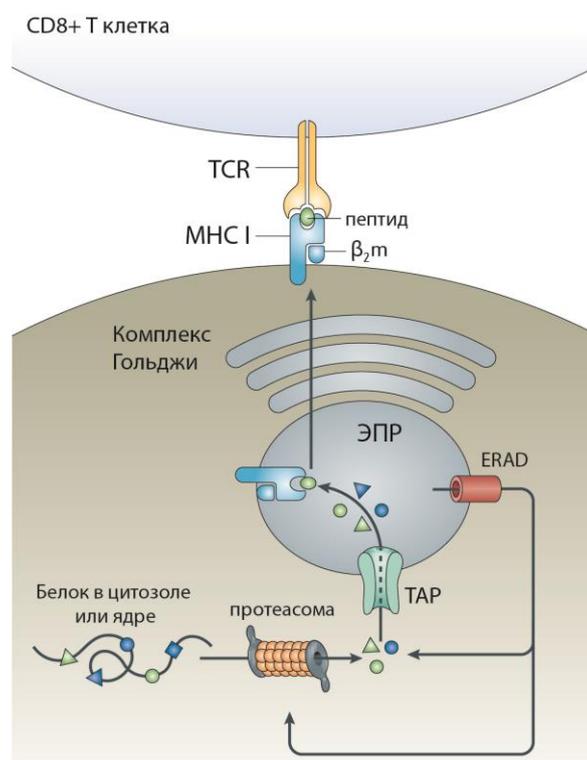


Рисунок 7. Роль протеасомы в презентации антигена на МНС I. Адаптировано из [59].

Существует несколько различных ферментов, которые локализованы в цитозоле и могут осуществлять гидролиз пептида-предшественника до антигенного пептида: пурамицин-чувствительная аминопептидаза, трипептидил-пептидаза II, блеомицин-гидролаза, лейцил-аминопептидаза (IFN γ -индуцибельная) [62]. Трипептидил-пептидаза II обладает как экзо-, так и эндопротеазной активностью, она расщепляет полипептидную цепь после остатков лизина. Предполагают, что она может работать как совместно с протеасомой, отщепляя дополнительные аминокислоты с N-конца пептида, так и независимо от нее, генерируя эпитопы, которые не могут быть получены в результате гидролиза протеасомой. Это подтверждается тем, что некоторые эпитопы эффективно презентуются даже при практически полном ингибировании протеасомы, однако ингибирование трипептидил-пептидазы II подавляет их презентацию [61, 63]. Другая функция локализованных в цитозоле пептидаз – деградация пептидов до аминокислот, так как далеко не все пептиды, полученные в результате действия протеасомы, презентуются на молекулах МНС (**Рис. 8**). Помимо упомянутых выше пептидаз, важную роль в этом процессе играет специальный фермент – тимет-олигопептидаза, расщепляющий внутренние пептидные связи в пептидах длиной 6-17 а.о. Так, для наиболее эффективно презентующихся эпитопов лишь одна белковая молекула из 100 деградированных протеасомой служит источником пептида, образующего комплекс с молекулой МНС I; для менее эффективно презентующихся эпитопов это соотношение составляет 1:10000 и выше [61].

Молекулы МНС I класса по структуре представляют собой гликопротеины, состоящие из вариабельной тяжелой цепи длиной около 350 аминокислотных остатков и константной легкой цепи, известной также как β 2-микроглобулин, около 100 а.о. длиной. МНС человека также называется «лейкоцитарный антиген человека» или HLA. α 1 и α 2-домены тяжелой цепи формируют пептид-связывающую бороздку размерами приблизительно 1x2.5 нм. Пептиды прочно связаны с молекулой МНС I, N и C-концы пептида сближены с аминокислотными остатками молекулы МНС и взаимодействуют с ними. Кроме того, боковые группы некоторых аминокислот пептида взаимодействуют с соответствующими аминокислотными остатками молекулы МНС I, образуя карманы. Местоположение и форма карманов зависит от аллельной формы молекулы. Высокий полиморфизм генов МНС класса I обеспечивает различную пептидную специфичность соответствующих белковых молекул.

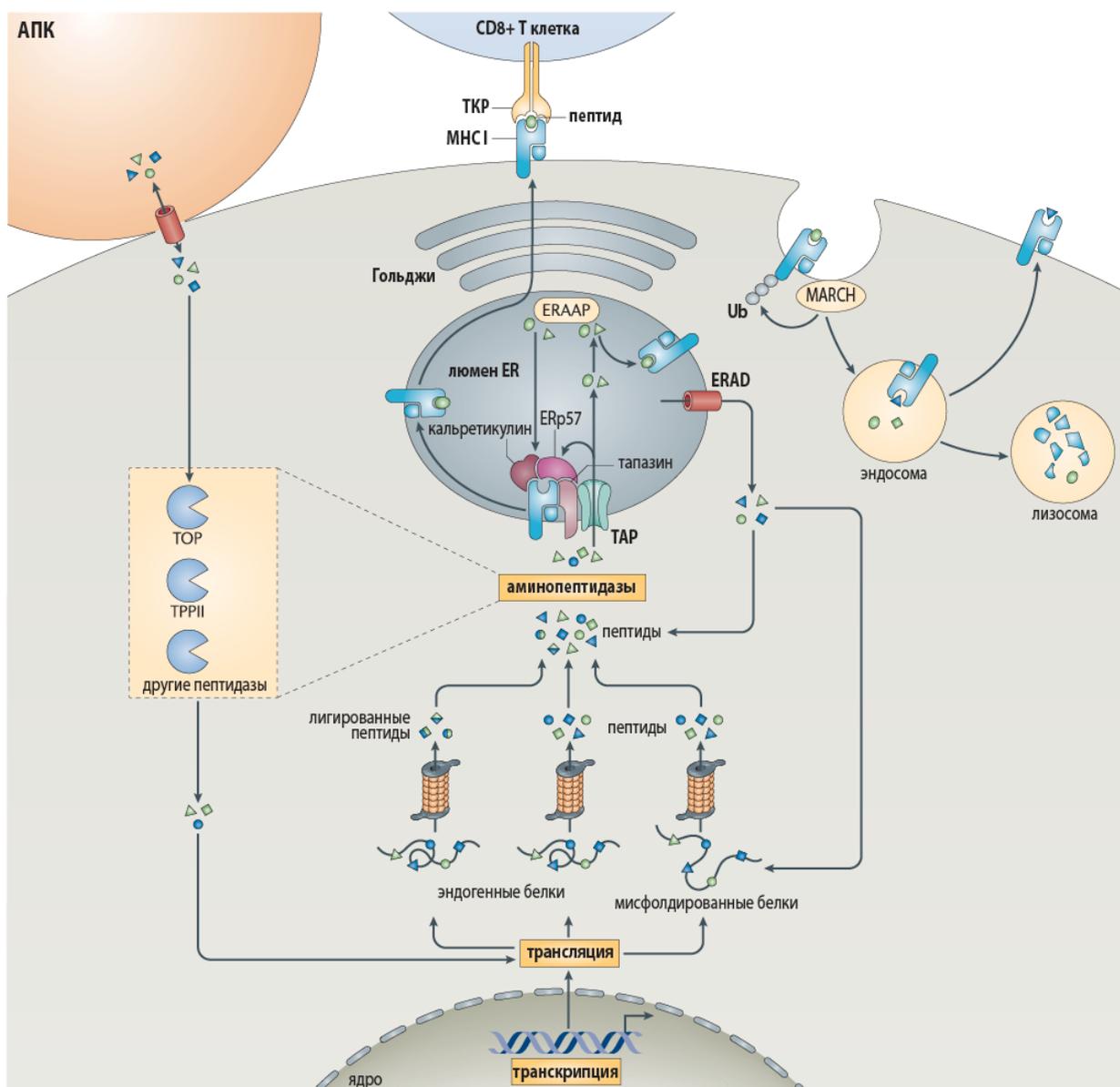


Рисунок 8. Процессинг антигена для презентации на МНС I. Адаптировано из [59].

Существуют два типа протеолитических каскадов, базирующихся на убиквитин-протеасомной системе и вовлеченных в презентацию антигена. Конститутивный протеолитический каскад необходим для уничтожения и эффективной деградации короткоживущих регуляторных, неправильно свернутых или потенциально токсичных белков до отдельных аминокислот. Эта конститутивная система контролирует гомеостаз клеточных белков и работает с высокой эффективностью, поэтому только небольшая часть полипептидов избегает воздействия аминокептидаз и презентуется на клеточной поверхности. Иммуно-адаптивный протеолитический каскад, компоненты которого экспрессируются в клетке при стимуляции интерфероном-гамма, нужен для генерации соответствующих антигенных пептидов, что позволяет большему количеству пептидов избежать деградации до аминокислот и презентироваться на молекулах МНС I класса. В

клетке два этих каскада существуют одновременно, но при иммунном ответе баланс быстро смещается в сторону иммунно-адаптивного каскада. Этот каскад включает в себя иммунопротеасому, регулятор PA28 и несколько интерферон-гамма-индуцибельных аминокептидаз [19].

Помимо иммуносубъединиц, фактора созревания протеасомы и PA28 $\alpha\beta$, к IFN γ -индуцибельным компонентам иммунно-адаптивного каскада относятся IFN γ -индуцибельные TAP1 и TAP2, обуславливающие эффективный транспорт пептидов в ЭР [19], а также некоторые аминокептидазы: лейциновая аминокептидаза, локализованная в цитозоле, и ERAAP (ER-resident aminopeptidase), локализованная в ЭР и играющая одну из ключевых ролей в процессинге антигенных пептидов [64].

Описанные выше пути процессинга антигенов являются наиболее часто встречающимися, вместе с тем существуют и другие, менее распространенные. На МНС-I могут презентироваться экзогенные антигены а на МНС-II – внутриклеточные антигены, отсутствующие во внеклеточной среде [65, 66].

Рассеянный склероз

Общая характеристика заболевания

Среди заболеваний аутоиммунной природы особое место занимает рассеянный склероз – хроническое заболевание центральной нервной системы. РС характеризуется разрушением миелиновой оболочки нервных волокон в головном и спинном мозге, что вызывает нарушение проведения нервного импульса. РС является наиболее распространенным демиелинизирующим заболеванием и развивается преимущественно у молодых людей в возрасте от 20 до 40 лет и при отсутствии адекватного лечения приводит к значимым нарушениям неврологических функций вплоть до невозможности самообслуживания. Поэтому РС находится на одном из первых мест среди причин нетрудоспособности и инвалидности в молодом возрасте. Количество больных варьирует в среднем от 10 (Япония) до 150 (Северная Европа и Америка) на 100 000 человек.

При рассеянном склерозе поражаются различные отделы ЦНС: чаще всего белое вещество вокруг желудочков мозга, в стволе мозга, в мозжечке и в шейном отделе спинного мозга. При этом формируются очаги демиелинизации ("бляшки"), которые имеют характерную форму и локализацию. Размеры очагов, как правило, составляют 1-5 мм, но иногда за счет слияния и отека они достигают 10 мм.

Симптомы рассеянного склероза различны и зависят от того, какой именно участок ЦНС подвергся поражению. У каждого больного имеется свой индивидуальный набор симптомов, их особое сочетание. Наиболее частые симптомы – нарушение движений,

координации, чувствительности, зрения, тазовых функций, а также различные нейропсихологические нарушения [67].

Различают две формы рассеянного склероза: ремитирующий РС – наиболее распространенная форма заболевания (85-90%), характеризующаяся чередованием процессов де- и ремиелинизации с полным восстановлением пациента при ремиссии. Ремитирующий РС в большинстве случаев через некоторое время переходит во вторично прогрессирующий РС. Подобное течение болезни приводит к необратимому повреждению миелиновой оболочки, все более усиливающемуся со временем. В 10-15% случаев после первого клинического проявления заболевание сразу переходит в прогрессирующее течение, так называемый первично прогрессирующий РС [68].

Этиология РС до сих пор не определена, но установлено, что на его возникновение и развитие влияет как генетическая предрасположенность, так и факторы окружающей среды. Предрасположенность к развитию РС определяется генами главного комплекса гистосовместимости HLA DR и DQ, а также некоторыми генами, кодирующими цитокиновые рецепторы, молекулы адгезии, и молекулы, участвующие в передаче клеточных сигналов. Факторы окружающей среды, повышающие вероятность возникновения рассеянного склероза, включают некоторые вирусные инфекции, курение, экологические характеристики зоны проживания и некоторые особенности питания [69].

Начальной стадией развития РС является активация аутореактивных Т- и В- клеток иммунной системы чужеродными микроорганизмами (по принципу молекулярной мимикрии), собственными белками или микробными суперантигенами. После контакта с антигенами на АПК активированные CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты продуцируют различные типы цитокинов. Развитие РС на клеточном уровне характеризуется инфильтрацией Т-клеток, активацией микроглии и притоком гемопозитических моноцитов в ЦНС. Иммунный ответ в основном направлен против олигодендроцитов – миелин-продуцирующих клеток.

Активированные лимфоциты, независимо от их специфичности, могут проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), образуемый эндотелиальными клетками сосудов головного и спинного мозга, астроцитами и периваскулярными клетками, что является важной составной частью пускового механизма аутоиммунных реакций в ЦНС. При развитии рассеянного склероза и ЕАЕ целостность ГЭБ нарушается, и он становится проницаемым как для белков с различной молекулярной массой, так и для клеток [70]. Наиболее значительные изменения в проницаемости ГЭБ наблюдаются в мозжечке, стволе головного мозга и спинном мозге, в то время как в коре головного мозга и стриатуме ГЭБ остается практически неизменным по сравнению с нормой.

Трансмиграция клеток иммунной системы через ГЭБ – это сложный процесс, в который вовлечено большое число поверхностных молекул сосудистого эпителия и лимфоцитов, а также многие секретируемые белки. Этот процесс включает в себя несколько стадий и основан на взаимодействии поверхностных молекул мигрирующей клетки с мембранными рецепторами эндотелиальных клеток [71]. Провоспалительные цитокины $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ и $IL-1$ стимулируют экспрессию на эндотелиальных клетках в ЦНС белков адгезии, таких как молекулы адгезии сосудистых клеток (VCAM-1), молекулы межклеточной адгезии (ICAM-1), E-селектинов и МНС II. Активированные Т-клетки связываются с молекулами адгезии и проникают в ЦНС. Кроме того, провоспалительные цитокины могут менять структуру ГЭБ, модифицируя организацию плотных межклеточных контактов между эндотелиальными клетками. Кроме того, в стимуляции миграции Т-лимфоцитов в ЦНС при РС важную роль играют хемокины, такие как IP-10 и RANTES [72]. Проникновение клеток иммунной системы в ЦНС сопровождается разрушением коллагена типа IV, являющегося основой внеклеточного матрикса, под действием матриксных металлопротеиназ, в особенности MMP-2 и MMP-9 [73]. Перед попаданием в паренхиму ЦНС Т-клетки могут реактивироваться повторно благодаря презентации антигенов АПК (микроглия, 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 [74, 75].

Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит.

Для проведения исследований на сегодняшний день существует хорошо изученная и общепринятая животная модель рассеянного склероза – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ). Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит можно развить у различных видов животных, но наиболее часто в исследованиях используют ЕАЕ, индуцированный у мышей или крыс [76]. В большинстве исследований ЕАЕ применяется для изучения биохимических, иммунологических и нейробиологических аспектов нейродегенеративных заболеваний, а так же для определения терапевтического потенциала создаваемых лекарственных препаратов. Вызвать развитие ЕАЕ можно двумя методами – активной индукцией и адаптивным переносом $CD4+$ или $CD8+$ Т-лимфоцитов от больных животных к генетически идентичным здоровым особям. Активная индукция заключается в иммунизации животных какими-либо антигенными компонентами миелина: основным белком миелина, миелин-олигодендроглиальным гликопротеином, протеолипидным протеином, некоторыми

пептидными фрагментами этих белков или гомогенатом спинного мозга генетически идентичных животных. Животным дополнительно вводят полный адъювант Фрейнда (инактивированные бактерии *Mycobacterium* в масляной эмульсии) для иммуностимуляции и *Pertussis toxin* для нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера. В зависимости от используемого антигена и линии животных ЕАЕ может быть острым, хроническим и ремитирующим. Имеются мышинные и крысиные модели ЕАЕ, имитирующие различные типы и стадии течения РС.

Роль Т-клеток в развитии рассеянного склероза и ЕАЕ

Большинство исследователей ведущую роль в патогенезе рассеянного склероза отводят аутореактивным CD4⁺ Th1 клеткам [77, 78] (Рис. 9). Это предположение основано на исследовании спинномозговой жидкости больных рассеянным склерозом которая содержит CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки вместе с остальными мононуклеарными лимфоцитами [79, 80], а также данных по изучению экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у мышей и крыс [81]. Одно из самых веских доказательств роли Т-клеток состоит в индукции ЕАЕ у животных при введении миелина или его компонентов с адъювантом или же при пересадке сенсibilизированных CD4⁺ Т-клеток от другой особи, уже имеющей ЕАЕ [68, 82]. Еще одно косвенное подтверждение состоит в генетической предрасположенности к рассеянному склерозу, реализующееся через локусы МНС класса II, комплекса, способного предоставлять антиген патогенным CD4⁺ Т-клеткам. Экспериментальные мыши, экспрессирующие оба типа МНС – DR-DQ, а также изолированный из больного МВР-специфичный Т-клеточный рецептор, проявляют как спонтанный, так и индуцированный ЕАЕ [68].

Влияние CD8⁺ Т-клеток на развитие РС изучено намного меньше, чем CD4⁺ клеток, однако существуют данные, свидетельствующие о том, что аутореактивные CD8⁺ Т-клетки также вовлечены в патогенез РС [83]. В крови больных RR-MS обнаружено повышенное количество СВ8⁺ Т-клеток, специфичных к нейроантигенам [84], а в очагах демиелинизации количество CD8⁺ Т-клеток почти в 10 раз превышает количество CD4⁺ Т-клеток [85]. Из клеток ЦНС только на клетках микроглии экспрессируются молекулы МНС II, узнаваемые CD4⁺ Т-клетками, в то время как молекулы МНС I, узнаваемые CD8⁺ Т-клетками, в условиях воспаления экспрессируются на всех типах клеток ЦНС [86]. Показано, что в олигодендроцитах происходит процессинг и презентация на МНС I антигенов, которые узнаются цитотоксическими CD8⁺ Т-клетками, которые способны взаимодействовать с миелиновой оболочкой нервных волокон, разрушая ее и приводя к снижению способности аксонов проводить нервный импульс [87]. Кроме того, CD8⁺ Т-

клетки, специфичные к основному белку миелина, способны лизировать олигодендроциты *ex vivo* [88]. Еще одним важным доказательством патогенного значения CD8⁺ Т-клеток является тот факт, что пересадка этих клеток от особи, уже имеющей ЕАЕ, здоровой генетически идентичной особи вызывает развитие данного заболевания [89].

Однако на данный момент очевидно, что наличие аутореактивных Т-клеток не является достаточным критерием для развития заболевания. Подобные МВР-специфичные клоны были обнаружены и у абсолютно здоровых доноров, что свидетельствует о гораздо более тонком механизме возникновения рассеянного склероза. Недавно появились сведения о значительной роли Т-регуляторных клеток (Тг или Трег) в патогенезе данного заболевания [90]. У трансгенных мышей, экспрессирующих исключительно МВР-специфичный Т-клеточный рецептор и проявляющих вследствие этого спонтанный ЕАЕ (линия Т/R-), возможно полностью предотвратить развитие аутоиммунного заболевания пересадкой CD4⁺ CD25⁺ регуляторных Т-клеток от нормальных мышей или мышей линии Т/R+, в которых лишь часть Т-клеток аутореактивна по отношению к МВР [91].

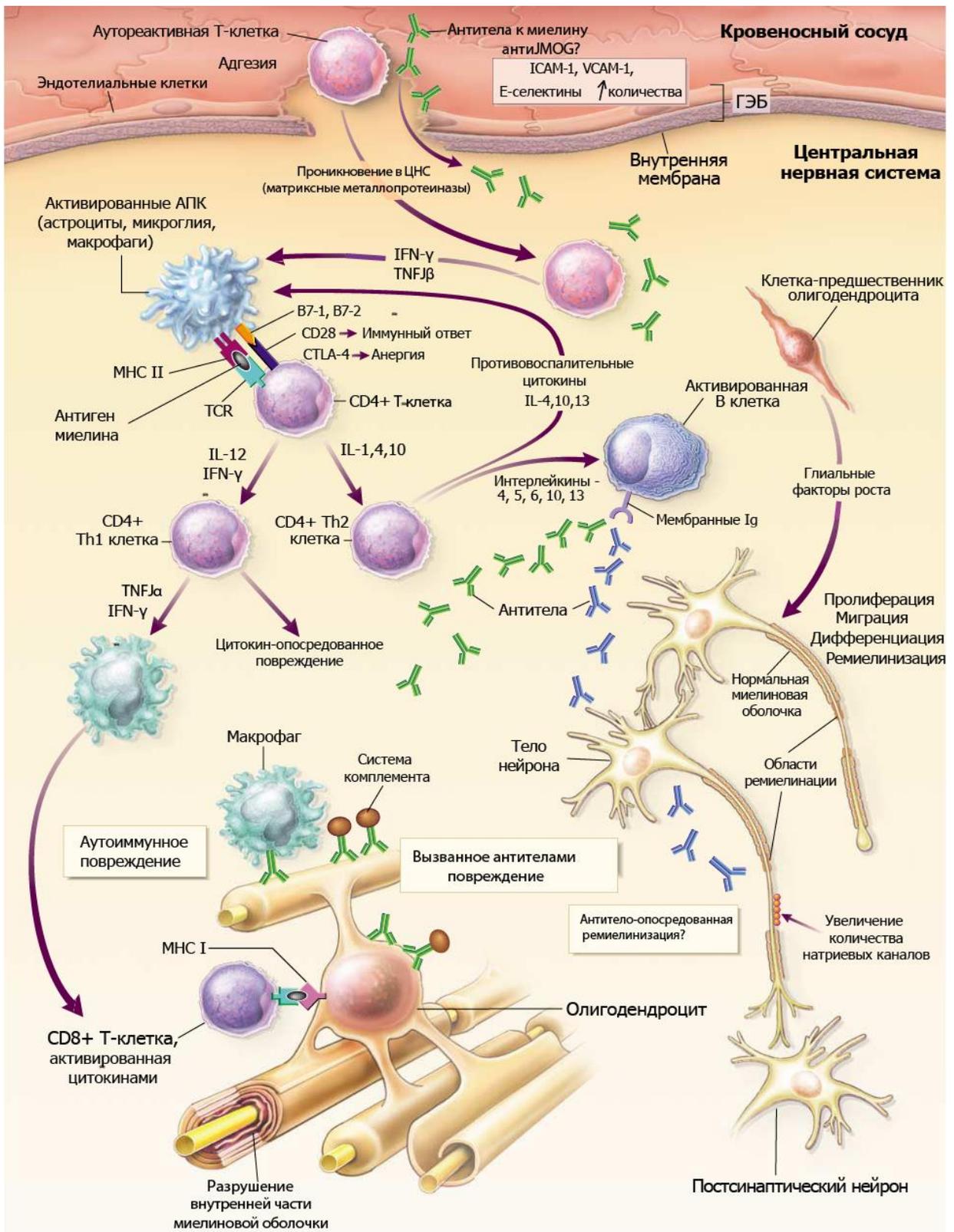


Рисунок 9. Патогенез рассеянного склероза. Адаптировано из [92].

Помимо Т-клеток, в патогенезе РС принимают участие В-клетки, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки и микроглия. В-клетки могут служить антиген-презентирующими для аутореактивных Т-клеток, привлекать их в центральную нервную систему и производить коstimуляцию [68]. Так, у больных детектируется повышенный

синтез в ткани мозга и спинномозговой жидкости антител, специфичных к основному белку миелина (MBP), протеолипидному протеину (PLP), миелин-олигодендроцитарному гликопротеину (MOG) [93], а также к ДНК и другим компонентам нервных тканей. В сыворотке крови больных РС обнаружены каталитические аутоантитела, которые сайт-специфически расщепляют MBP внутри иммунодоминантных фрагментов [94]. Дендритные клетки и микроглия служат антигенпрезентирующими клетками, обуславливающими активацию и дифференцировку различных подтипов Т-клеток. Тучные клетки вырабатывают цитокины и хемокины, привлекающие Т-лимфоциты в ЦНС, а также секретируют ферменты, вызывающие активацию матриксных металлопротеиназ; кроме того, они могут секретировать сами металлопротеиназы MMP-2 и MMP-9. Данные ферменты не только разрушают ГЭБ, но и протеолизуют MBP [68].

Основной белок миелина

Основная информация о структуре миелина получена с помощью электронной микроскопии. Уникальной морфологической особенностью миелина является то, что он формируется в результате спирального обвития отростков олигодендроцитов (в центральной нервной системе) и шванновских клеток (на периферии, вокруг аксонов нейронов) (**Рис. 10**). Таким образом, миелин представляет собой своеобразную мембрану, состоящую из липидного бислоя и белков, связанных с ним. Среди белков миелина выделяют так называемые внутренние и внешние белки. Первые прочно связаны с мембраной, проходя сквозь нее, в то время как другие, расположенные поверхностно, связаны слабее. Подобная мембрана является асимметричной по химическому составу и электрическому заряду. Процесс формирования миелина отростками глиальных клеток сопровождается вытеснением цитоплазмы из этих клеток таким образом, что цитоплазматические поверхности мембраны плотно соприкасаются друг с другом, образуя так называемую «главную плотную линию». Плотный контакт наружных поверхностей мембран, образующихся при спиралевидном обвитии отростков миелин-образующих клеток вокруг аксонов нейронов, способствует формированию так называемой «межпромежуточной линии». Одной из биохимических характеристик, которая отличает миелин от других биологических мембран, является высокое соотношение липид/белок. Белки составляют от 25 до 30% массы сухого вещества миелиновой оболочки. На долю липидов приходится приблизительно 70-75% от сухой массы белого вещества центральной нервной системы млекопитающих. Липидный состав миелина различен на внутренней и внешней сторонах клеточной мембраны, а также он различается в норме и при развитии аутоиммунных патологий ЦНС. Основными липидными компонентами

миелина являются холестерин, фосфатидилсерин, гидроксированные цереброзиды, сфингомиелин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин [95]. Основной функцией миелина является быстрое проведение нервного импульса по аксонам, которые он окружает. Мембраны клеток, формирующих миелин, плотно соприкасаются, что обуславливает высокое сопротивление и малую емкость, обеспечивая, таким образом, аксону эффективную изоляцию и предотвращает продольное распространение импульса. Миелин прерывается только в области перехватов Ранвье, которые встречаются через одинаковые промежутки длиной примерно 1 мм. В связи с тем, что ионные токи не могут проходить сквозь миелин, вход и выход ионов осуществляется лишь в области перехватов. Это приводит к существенному увеличению скорости проведения нервного импульса – по миелинизированным волокнам импульс проводится приблизительно в 5-10 раз быстрее, чем по не миелинизированным. Помимо передачи нервного импульса, миелин участвует в питании нервного волокна, а также выполняет структурную и защитную функции [96].

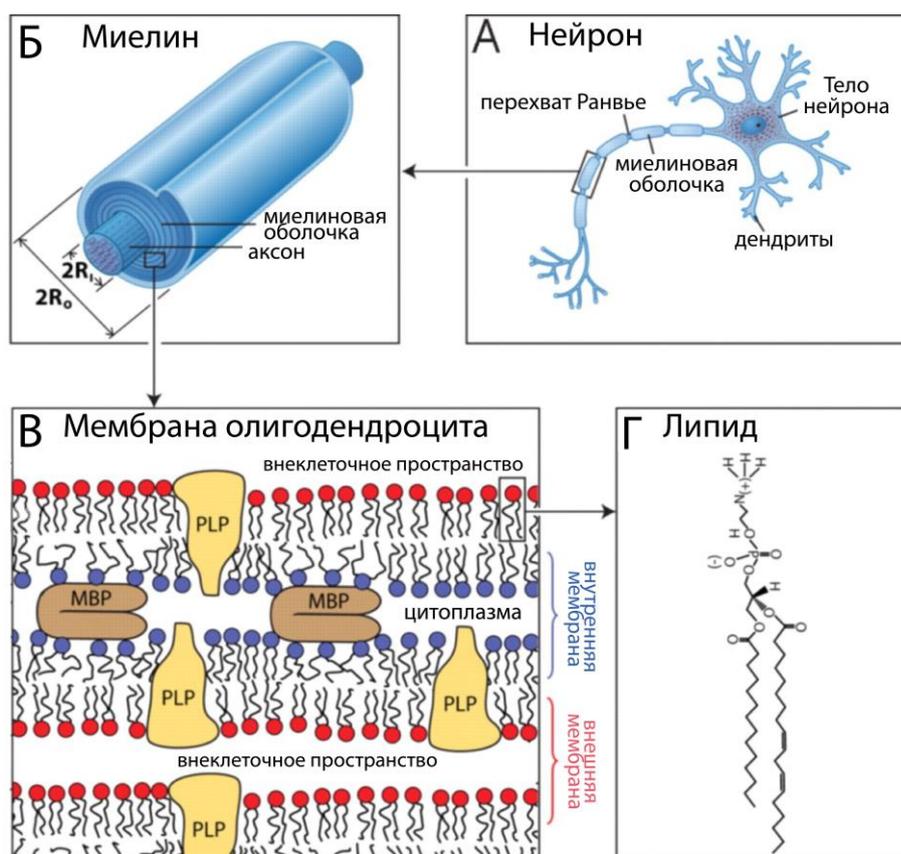


Рисунок 10. Строение миелина. Миелинизированный аксон (А), миелиновая оболочка (Б), двухслойные мембраны (В), фосфатидилэтанолламин (Г). Адаптировано из [95].

В качестве основных аутоантигенов при РС выделяют четыре белка миелиновой оболочки: основной белок миелина, миелин-олигодендрогликопротеин,

протеолипидный протеин 1 и миелин-ассоциированный гликопротеин. На сегодняшний день существует целый ряд работ, демонстрирующих повышение титра антител в сыворотке крови или цереброспинальной жидкости у пациентов с РС к данным аутоантигенам. Самым распространенным белковым компонентом миелина (около 50% всех белков) является протеолипидный белок (PLP) с молекулярной массой порядка 30 кДа. Вторыми в количественном соотношении (около 30%) являются три изоформы основного белка миелина. Известно, что ген МВР человека расположен на 18 хромосоме и имеет 3 промоторные области. В процессе созревания мРНК этого белка получается несколько альтернативных форм, различающихся числом экзонов и, следовательно, размером белка. Молекулярные массы получающихся полипептидов для разных животных лежат в диапазоне от 14.0 до 21.5 кДа. У человека присутствуют три сплайс-формы белка: с молекулярной массой 21.5 кДа (составлена из 7 экзонов), 18.5 кДа (из пяти экзонов) и 17.5 кДа (из двух экзонов). Показана значительная степень гомологии между аминокислотными последовательностями МВР (80–90%) среди млекопитающих. Так, в аминокислотных последовательностях МВР человека и быка имеются различия аминокислотных остатков лишь в нескольких положениях, в то время как МВР крысы отличается от МВР человека и быка положением 40 а. о. в середине полипептидной цепи (от 118 до 157 остатка) [97].

МВР характеризуется необычайно высоким содержанием (~25%) основных аминокислот (аргинин, лизин и гистидин), равномерно распределенных по всей полипептидной цепи, что и обуславливает очень высокую изоэлектрическую точку МВР (pI 11.5–13.0). Основная изоформа МВР с M 18.5 кДа подвергается нескольким посттрансляционным модификациям, в том числе фосфорилированию, ацетилированию N -конца, дезамидированию глутамина и аспарагина и деиминированию остатков аргинина. Все это приводит к микрогетерогенности по заряду у молекул белка. Одним из главных источников гетерогенности считается фосфорилирование и деиминирование. Такая микрогетерогенность зарядов может варьировать у различных индивидуумов в зависимости от возраста и патологического состояния организма. Так, например, МВР-компонент 1 (С1) соответствует изоформе с максимальным положительным зарядом, в которой ни один из 19 аргининов не модифицирован, а МВР-компонент 8 (С8) соответствует изоформе, в которой 6 из 19 аргининов преобразованы в цитруллин. Интересно отметить, что количество компонента С8 значительно возрастает в тканях мозга пациентов, страдающих РС [98]. Например, в головном мозге взрослого человека 20% от общего количества МВР существует в С8-изоформе, при РС количество этой изоформы возрастает до 45%, а при остром склерозе Марбурга доходит до 80% и выше

[99]. В последнем случае у МВР 18 из 19 остатков аргинина подвергаются модификации. Чрезвычайно важный эффект деиминирования ОБМ был установлен коллективом авторов в работе [100]. Они показали, что в форме С8 участок V83-T92 теряет свою спиральную структуру, что приводит к его выпетливанию из билипидного слоя и повышенной чувствительности к протеолизу, что делает его гораздо более доступным компонентам иммунной системы [101]. Потеря положительного заряда также приводит к повышенной чувствительности МВР к протеазам. Установлено, что при деиминировании более чем 7 положительно заряженных остатков аргинина молекула МВР становится крайне чувствительна к протеолизу катепсином D [102]. Аналогичные результаты были получены в случае деградации МВР матриксной металлопротеиназой-3 (ММР-3) [103]. Еще одна протеаза, по-видимому вовлеченная в процесс протеолиза и презентации МВР, это трипсин-4 [104]. Кроме того, при рассеянном склерозе и ЕАЕ в протеолизе МВР и образовании иммуногенных пептидных эпитопов участвуют кальпаин [105], а также ряд матриксных металлопротеиназ [106]. Интересно отметить, что МВР также способен к автокаталитическому разрушению, что может быть альтернативным механизмом его презентации иммунной системе [107]. Авторы в очередной раз отмечают, что деиминированный МВР С8 легче подвергается самодеградации, в то время как присутствие липидов, наоборот, стабилизирует белок.

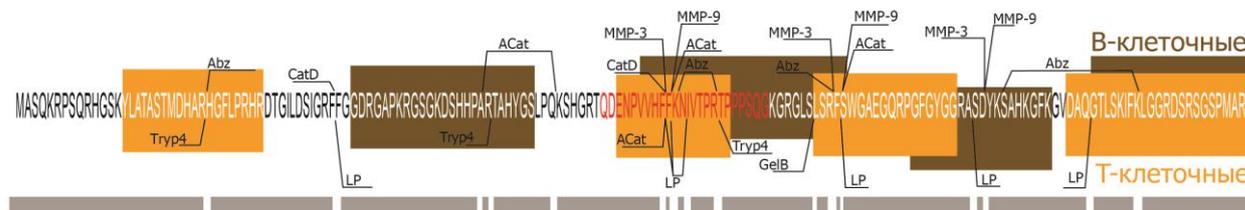


Рисунок 11. Аминокислотная последовательность МВР, иммунодоминантные Т-клеточные (оранжевый цвет) и В-клеточные (коричневый цвет) эпитопы и сайты протеолиза: Abz – каталитическими антителами (абзимами), CatD – катепсин D, MMP-3 – матриксная металлопротеиназа 3, MMP-9 – матриксная металлопротеиназа-9, Tryp4 – трипсин-4, ACat – автокаталитическое расщепление, LP – лизосомные протеазы. Адаптировано из [108].

Роль протеасомы в развитии РС и ЕАЕ

Как уже упоминалось ранее, убиквитин-протеасомная система участвует в регуляции множества клеточных процессов, поэтому логично было бы предположить, что изменения в каталитической активности и субстратной специфичности протеасомы влияют на многие процессы, протекающие при развитии воспаления: передачу сигнала цитокинами, пролиферацию клеток иммунной системы, уничтожение дефектных и

вредоносных белков, презентацию антигена на МНС I. Имунопротеасома обуславливает поддержание белкового гомеостаза в условиях окислительного стресса, вызванного действием интерферонов на клетку [109]. Недавно было показано, что иммунопротеасома участвует в продукции цитокинов и дифференциации Т-клеток [53]. У экспериментальных животных, нокаутных по иммуносубъединицам протеасомы, меняется репертуар Т-клеточных рецепторов, количество CD8⁺ Т-клеток и их способность к дифференциации, и уровень продукции провоспалительных цитокинов [110]. Кроме того, у мышей, нокаутных по $\beta 1i$, наблюдалось замедленное развитие и созревание В-клеток, проблемы с продукцией определенных изотипов антител и активацией дендритных клеток. Авторы связывают эти изменения с пониженным уровнем продукции фактора транскрипции NF- κ B в результате изменений в субстратной специфичности протеасомы [111]. NF- κ B образуется при протеолизе его предшественника I κ B протеасомой, транслоцируется в ядро и активирует ряд генов, многие из которых так или иначе вовлечены в работу иммунной системы.

Известно, что под действием провоспалительных цитокинов в клетках различных типов повышается уровень экспрессии иммуносубъединиц протеасомы. При развитии рассеянного склероза содержание иммунопротеасомы и регулятора PA28 $\alpha\beta$ увеличивается по сравнению с нормой во многих типах клеток: олигодендроцитах, астроцитах, макрофагах, микроглии и инфильтрирующих лимфоцитах [112]. У мышей линии C57BL/6, иммунизированных MOG₃₅₋₅₅, в острой фазе ЕАЕ в головном мозгу увеличивалось содержание всех трех иммуносубъединиц протеасомы и регулятора PA28 $\alpha\beta$, а в хронической фазе уменьшалось содержание конститутивных субъединиц по сравнению с неиммунизированными мышами [113]. Увеличение содержания иммуносубъединиц протеасомы в головном мозге при ЕАЕ наблюдалось также у крыс линии LEW-1N, иммунизированных MOG₁₋₁₂₅ [114].

Об участии иммунопротеасомы в презентации аутоантигенов аутореактивным CD8⁺ Т-клеткам при РС косвенно свидетельствуют данные, полученные в работе [112]. Под действием иммунопротеасомы, содержащей мутантную форму $\beta 1i$ иммуносубъединицы – НН60, при гидролизе МВР *in vitro* образовывалось пониженное количество эпитопа МВР₁₁₁₋₁₁₉. Этот эпитоп презентуется на МНС I гаплотипа HLA-A*02, и специфичные к нему CD8⁺ Т-клетки присутствуют в крови больных РС. Кроме того, у пациентов с РС, имеющих данный гаплотип HLA, мутантная форма $\beta 1$ иммуносубъединицы НН60 встречается значительно реже, чем в контрольной популяции с данным гаплотипом HLA. Это позволяет предположить, что пониженный риск развития РС у субъектов с HLA-A*02 и НН60 как минимум частично обусловлен пониженным количеством

иммунодоминантного эпитопа MBP₁₁₁₋₁₁₉ в олигодендроцитах и антиген-презентирующих клетках [112].

Современные подходы к терапии рассеянного склероза

Лечение РС остается одной из наиболее серьезных проблем современной медицины, хотя достигнутый в последние годы существенный прогресс в понимании механизмов развития заболевания и его патогенеза позволил создать ряд эффективных подходов в терапии данного аутоиммунного заболевания. Если ранее терапия пациентов с РС сводилась лишь к попыткам купирования обострений заболевания и проведению симптоматического лечения, то к настоящему времени появились пути прямого воздействия на течение болезни.

На сегодняшний день в терапии РС используются несколько типов препаратов:

1) Глатирамера ацетат, Сорахоне (GA) - это полипептид длиной 40-100 а.о., включающий в себя случайную комбинацию аланина, лизина, глутамата и тирозина в соотношении 4.5:3.6:1.5:1 соответственно [115]. Структурно Сорахоне имитирует положительно заряженный иммунодоминантный фрагмент MBP. Действие Сорахоне предположительно состоит в конкуренции с фрагментами основного белка миелина за связывание с молекулами ГКГС класса II DR, а также в индукции регуляторных Т-клеток (тип T_H2/3), секретирующих противовоспалительные цитокины ИЛ-4, ИЛ-10 и нейротрофический фактор головного мозга.

2) Препараты на основе интерферона-β который инициирует ряд антипролиферативных и иммуномодулирующих реакций [116].

3) Митоксантрон [117] – ингибитор топоизомеразы II типа, обладающий общим иммуносупрессорным эффектом. Применяется достаточно редко из-за большого количества побочных действий.

4) Моноклональные антитела, направленные против определенных молекул, участвующих в патогенезе заболевания. Natalizumab – моноклональное антитело к интегрину α4β1. Связываясь с интегринами, блокирует адгезию моноклеарных клеток с не охарактеризованными рецепторами на поверхности стромальных эндотелиальных клеток [118]. Это приводит к предотвращению миграции аутореактивных лимфоцитов через ГЭБ и в воспаленные ткани. Rituximab - антитело к рецептору CD20, содержащееся на мембране зрелых В-клеток [118, 119]. Терапия препаратом Rituximab приводит к системному влиянию на продукцию антител, цитокиновую сеть, презентацию антигена В-клетками, активацию Т-клеток и макрофагов [120-124]. Еще несколько моноклональных антител для терапии РС в настоящее время проходят клинические испытания [125].

5) Перорально применяющиеся иммуномодулирующие препараты, изменяющие течение РС. Fingolimod (FTY720) - ингибитор SP1-ассоциированных G-опосредованных рецепторов, предотвращает миграцию лимфоцитов в ЦНС [126]; Teriflunomide - ингибитор пролиферации Т клеток [126]; Диметил фумарат (Tecfidera, BG-12) - индуцирует продукцию цитокинов Th2 типа [127-129].

Тем не менее, стоит отметить, что вопреки впечатляющему массиву клинических, иммунологических и биохимических данных, а также частично изученным молекулярным механизмам, лежащих в основе возникновения и развития заболевания, на сегодняшний день не существует препарата, способного полностью остановить патологические процессы при РС. Современные методы терапии РС являются не слишком эффективны в отношении прогрессирующих форм рассеянного склероза. Многие из них обладают выраженными побочными действиями, в частности, общей иммуносупрессией. Кроме того, все использующиеся в настоящее время подходы к терапии направлены на то, чтобы замедлить прогресс заболевания, а способы вызвать ремиелинизацию и регенерацию клеток ЦНС при РС в настоящий момент сильно ограничены [130]. В связи с этим актуальной проблемой остается поиск новых терапевтических мишеней и разработка альтернативных методов терапии РС. Некоторые из них в настоящее время активно изучаются и проходят испытания на лабораторных животных с экспериментальной моделью рассеянного склероза. Перспективные подходы к терапии РС перечислены ниже.

1) Селективная элиминация аутореактивных В-клеток при помощи иммунотоксинов. Молекулы иммунотоксинов состоят из двух ключевых фрагментов: сигнальной последовательности адресной доставки к клетке-мишени и действующей части, приводящей к убийству клетки [131]. В качестве сигнальной последовательности могут выступать любые молекулы, имеющие аффинность к белкам, экспонированным на поверхности клетки: антитела, Fab фрагменты антител, гормоны, цитокины, клеточные факторы, в случае терапии аутоиммунных заболеваний, последовательности, специфичные для поверхностных Т- или В-клеточных рецепторов [131, 132]. В качестве цитотоксического домена применяют каталитический домен растительных или бактериальных токсинов. Адресная доставка терапевтических агентов имеет два основных преимущества по сравнению с неспецифической терапией: направленная терапия позволяет применять лекарства в меньших концентрациях, что уменьшает общее неспецифическое цитотоксическое воздействие препарата на организм; цитотоксическое воздействие препарата сказывается в основном на клетках-мишенях.

2) Антиген-специфическая терапия, которая направлена на аутоиммунные Т- и В-клетки, специфичные к определенной антигенной детерминанте. Примером такого

подхода является широко используемая в настоящее время терапия глатирамер ацетатом. Недавно группа исследователей показала, что модифицированные варианты Сорахон – сополимеры FУАК и VWАК еще более эффективно супрессируют ЕАЕ на модельных животных [133]. Авторы объясняют это лучшим связыванием данных полимеров с молекулами МНС II. Перспективным направлением является введение так называемых “измененных пептидных лигандов” (ИПЛ), взаимодействующих с Т-клеточными рецепторами. Принцип работы данного метода, основанного на иммунодоминантных пептидах, заключается в индукции иммунотолерантности при введении большой дозы антигена. ИПЛ являются модифицированными [134], мутированными [135] или укороченными [136] участками последовательностей, связывающихся с Т-клеточными рецепторами. ИПЛ могут частично активировать Т-клетки, переключая их с фенотипа Th1 на Th2, а также, в некоторых случаях, индуцировать переход Т-клетки в анергию.

3) Регенеративный подход к терапии, который заключается в применении бензтропина. Бензтропин (Cogentin) в настоящее время применяется в терапии болезни Паркинсона и является антагонистом мускариновых рецепторов M1 и M3. Недавно было показано, что бензтропин вызывает дифференциацию олигодендроцитов, повышение уровня экспрессии МВР и миелинизацию аксонов *in vitro* и снижает тяжесть протекания экспериментальной модели ремитирующего РС у мышей [137].

4) Использование антиоксидантов, блокирующих один из механизмов неспецифического повреждения нервной ткани. Потенциально возможно как стимулировать собственную антиоксидантную систему, так и внести извне препараты, обладающие антиоксидантной активностью [138]

5) Использование ингибиторов протеасомы. Как уже упоминалось ранее, иммунопротеасома постоянно экспрессируется в клетках иммунной системы, а ее ингибирование или нокаут приводят к подавлению дифференциации Т-клеток, снижению продукции цитокинов и хемокинов и другим иммуносупрессорным эффектам. Поэтому как специфические ингибиторы иммунопротеасомы, так и неспецифические ингибиторы всех каталитических субъединиц представляют большой интерес как потенциальные терапевтические агенты против аутоиммунных заболеваний, в частности против рассеянного склероза. Показано, что ингибитор PR-957, специфический к $\beta 5i$ каталитической субъединице иммунопротеасомы, снижает тяжесть течения заболевания и предотвращает возникновение обострений в экспериментальной модели ремитирующего РС у мышей [139]. Положительные результаты в терапии ЕАЕ также

давали ингибиторы протеасомы, воздействующие одновременно на конститутивные и иммуносубъединицы: PS-341 [114], PS-519 [140] и ритонавир [141].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование роли модификации МВР убиквитином в процессе деградации протеасомой

Внутриклеточная деградация МВР протеасомой в клетках млекопитающих

На настоящий момент известно, что один из основных нейроантигенов, МВР и его пептидные фрагменты могут индуцировать аутоимунную нейродегенерацию (ЕАЕ) и в этом смысле они обладают энцефалитогенными свойствами и участвуют в формировании аутоиммунного ответа [142, 143]. Показано что МВР подвергается каталитической деградации различными ферментами и каталитическими антителами [94, 144]. Недавно установлено, что комбинация структурных фрагментов МВР может быть использована в качестве лекарственного средства при терапии РС [145, 146]. В связи с этим большой интерес представляет изучение метаболизма внутриклеточного МВР в норме и патологии. В эукариотической клетке существует две основных системы деградации, – лизосомная и протеасомная. Подавляющее большинство внутриклеточных белков гидролизуется 26S протеасомой по убиквитин-зависимому пути. Убиквитин-протеасомная система вовлечена в патогенез многих нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, амиотропный латеральный склероз, прионовые болезни и ряд других [147].

Первым этапом нашего исследования было выяснение роли полиубиквитинилирования в процессе внутриклеточного гидролиза МВР. Деградацию МВР изучали с использованием клеток НЕК, трансфицированных генетической конструкцией, кодирующей слитный белок, состоящий из рекомбинантного МВР человека и FLAG-эпитопа. В качестве контроля использовали зеленый флуоресцентный белок (GFP), который, как известно из литературы [148], не подвергается гидролизу протеасомой (**Рис.12А**). МВР иммунопреципитировали из лизатов клеток, обработанных и необработанных высокоспецифичным ингибитором протеасомы PS-314, и далее анализировали методом вестерн-блоттинга. В обоих случаях в образцах отсутствовали какие-либо значимые количества убиквитинилированных форм МВР (**Рис.12Б**), несмотря на очевидное накопление полиубиквитиновых конъюгатов клеточных белков при ингибировании протеасомы. Чтобы определить время полужизни внутриклеточного МВР, клеточные культуры обрабатывали циклогексимидом – реагентом, блокирующим рибосомальный синтез белка, в этом случае процесс синтеза белка не интерферирует с его протеолизом. Вестерн-блоттинг лизатов клеток, обработанных циклогексимидом в течение различных временных промежутков (**Рис. 12В**), показал, что в клетках НЕК МВР

достаточно быстро подвергается протеолизу со средним временем полужизни около 1 часа. При этом протеолиз MBP очевидно осуществляется протеасомой, т.к. в присутствии PS-341 его деградация практически полностью останавливается. Количество GFP, не являющегося субстратом для протеасомы, с течением времени остается практически неизменным.

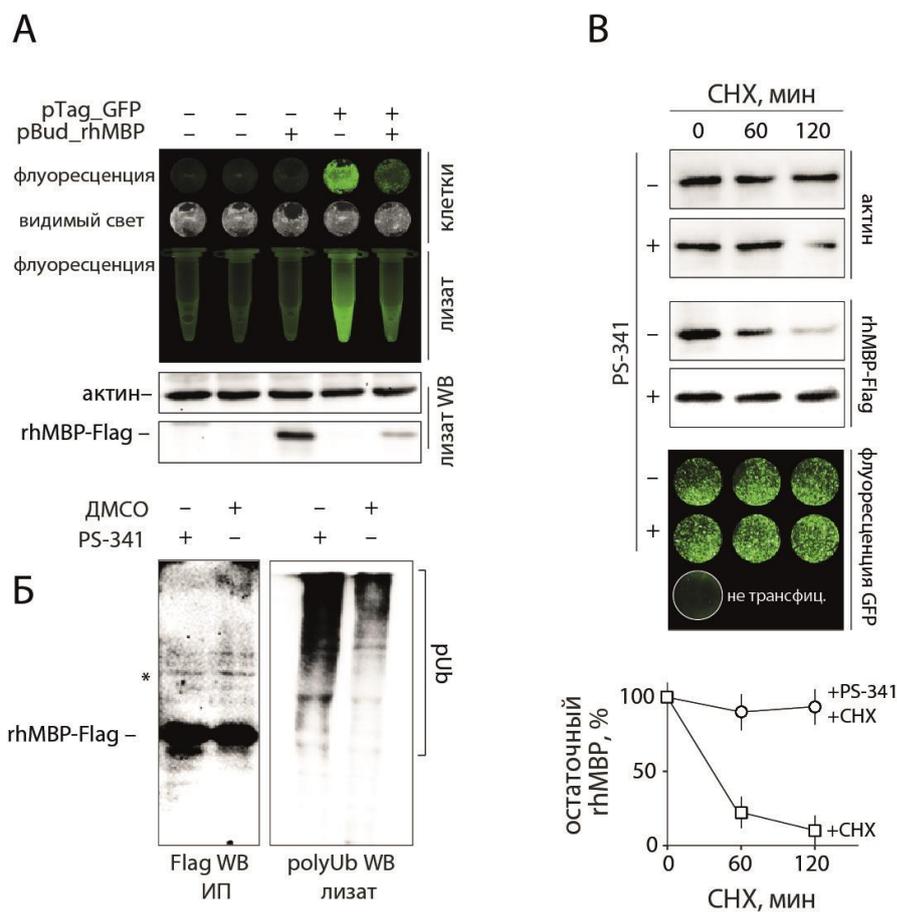


Рисунок 12. А. Клетки НЕК, трансфицированные и не трансфицированные генетическими конструкциями, кодирующими рекомбинантный МВР человека (rhMBP) или GFP и вестерн-блоттинг (WB) их лизатов. В качестве контроля процедуры нанесения применяли гибридизацию этой же мембраны с моноклональными антителами к β -актину (актин) Б. Клетки НЕК трансфицировали генетической конструкцией, кодирующей МВР, через 24 часа обрабатывали PS-341 или ДМСО, лизировали и провели иммунопреципитацию (ИП) с использованием антитела к FLAG-эпиту. Вестерн-блоттинг элюатов (слева), гибридизация с анти-FLAG антителом. Вестерн-блоттинг исходных лизатов (справа), гибридизация с антителом к полиубиквитиновым конъюгатам. В. Определение скорости протеолиза белков в клетке с использованием циклогексимида (CHX).

Для анализа протеолиза внутриклеточного МВР протеасомой в условиях, более приближенных к физиологическим, были проведены аналогичные эксперименты в культуре зрелых олигодендроцитов мыши. Для этого нами была получена первичная нейральная культура, обогащенная олигодендроцитами. Иммуноцитохимический анализ подтвердил наличие значительного количества OSP-позитивных клеток (oligodendrocyte-specific protein, олигодендроцит-специфический белок), при этом процентное содержание

GFAP-позитивных клеток (glial fibrillary acidic protein, маркер астроцитов) не превышало 10% (**Рис. 13А**). Для усиления экспрессии эндогенного MBP клетки обрабатывали 0.2 mM раствором бензотропина в течение двух суток перед анализом [137]. Важно отметить, что внутриклеточный MBP заметно накапливался под действием ингибитора протеасомы PS-341 (**Рис. 13Б**), что свидетельствует о протеасомной природе метаболизма MBP в олигодендроцитах.

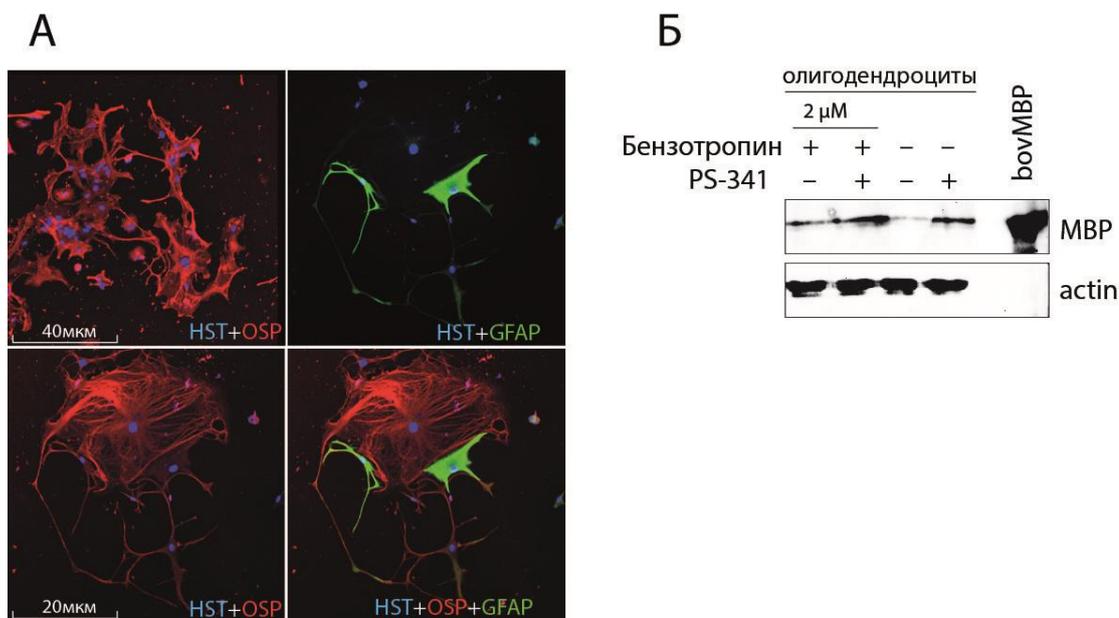


Рисунок 13. Протеолиз MBP в культуре олигодендроцитов. А. Иммуноцитохимическое окрашивание культуры зрелых олигодендроцитов. HST – ядерный краситель Hoechst 33342, OSP – анти-OSP антитело, GFAP – анти-GFAP антитело. Б. Вестерн-блоттинг лизатов культуры зрелых олигодендроцитов, обработанных и необработанных PS-341 и бензотропином. Гибридизация с антителами, специфичными к MBP и актину.

В подавляющем большинстве случаев модификация белка остатками убиквитина является необходимым и достаточным сигналом для его протеасомной деградации. Для того чтобы подвергнуться гидролизу протеасомой, белок в абсолютном большинстве случаев должен быть убиквитинилирован [31]. Чтобы определить, подвергается ли MBP убиквитинилированию в клетках, рекомбинантный MBP-FLAG иммунопреципитировали из гомогената клеток НЕК, котрансфицированных генетическими конструкциями, кодирующими rhMBP-FLAG и убиквитин, слитный с HA-эпитопом (HA-Ub) (**Рис. 14**). HA-Ub наряду с убиквитином дикого типа включается в формирующиеся полиубиквитиновые цепи и может быть детектирован методом вестерн-блоттинга. В качестве положительного контроля использовали прекурсор NF-κB белок p105, слитный с FLAG-эпитопом, который, как известно, подвергается гидролизу протеасомой по убиквитин-зависимому пути [40]. В качестве отрицательного контроля использовали

белок Ubc6. После обработки клеток ингибитором протеасомы MG132 в преципитатах, содержащих MBP-FLAG, отсутствовали даже следовые количества полиубиквитиновых конъюгатов, в то время как в преципитатах, содержащих p105-FLAG, полиубиквитиновые конъюгаты явно присутствовали. Таким образом, можно предположить, что в клетках млекопитающих MBP подвергается гидролизу протеасомой вероятнее всего в отсутствие полиубиквитинилирования.

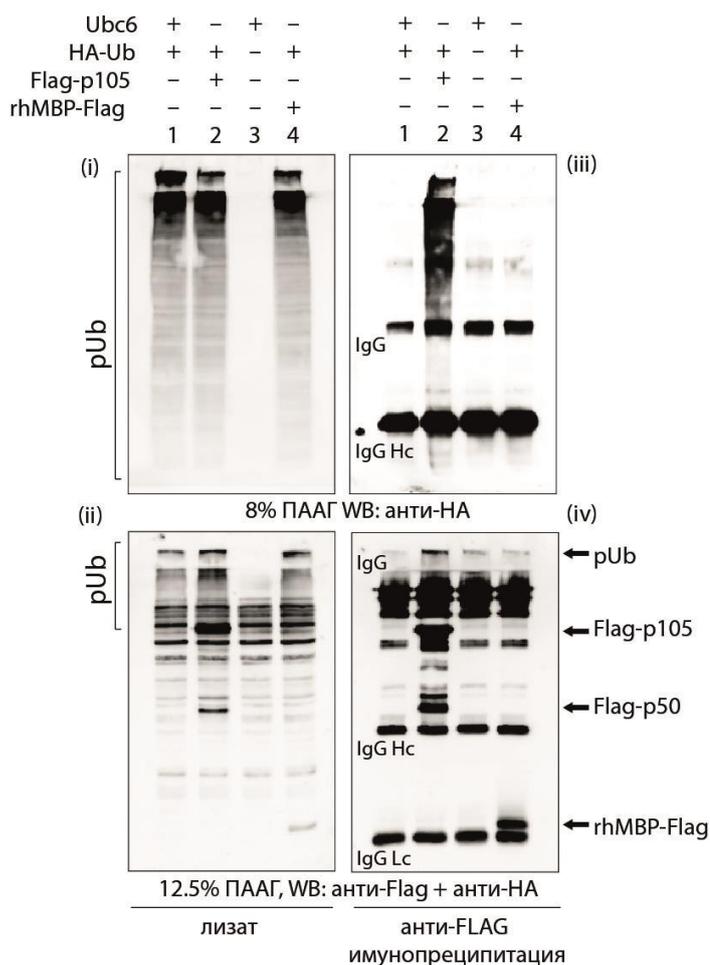


Рисунок 14. Клетки линии НЕК трансфицировали генетическими конструкциями, кодирующими белки, указанные в таблице вверху, лизировали и подвергали иммунопреципитации анти-FLAG антителом. Исходные лизаты (слева) и соответствующие им элюаты после иммунопреципитации (справа) анализировали методом вестерн-блоттинга с окрашиванием анти-FLAG и анти-HA антителами. ПААГ – полиакриламидный гель, IgG – присутствующее в элюате анти-FLAG антитело, IgG Hc – его тяжелая цепь, IgG Lc – его легкая цепь.

Чтобы определить, необходимо ли полиубиквитинилирование для гидролиза MBP протеасомой, были проведены дополнительные эксперименты с использованием генетической конструкции, кодирующей вариант убиквитина K0 (UbK0), а также малыми интерферирующими РНК, блокирующими экспрессию убиквитин-лигазы E1 (E1 siRNA).

UbK0 – это вариант убиквитина, в котором все остатки лизина заменены на остатки аргинина, и вследствие этого он не способен образовывать полиубиквитиновые цепи [40]. E1 – это убиквитин-активирующий фермент – ключевой фермент системы убиквитинилирования, который осуществляет прайминг каскада полиубиквитинилирования [31]. Клетки линии НЕК были трансфицированы генетическими конструкциями, кодирующими UbK0 или убиквитин дикого типа (Ub WT), слитных с мус эпитопом (**Рис. 15А и 15Б**). Во втором случае клетки были трансфицированы E1 siRNA или irrelevantной siRNA в качестве контроля (**Рис. 15В и 15Г**). Спустя 24 часа клетки были повторно трансфицированы генетическими конструкциям, кодирующими белки MBP, с-Мус или орнитиндекарбоксилазу (ornithine decarboxylase, ODC) и еще спустя 24 часа анализировали внутриклеточный протеолиз с использованием циклогексиимида. С-Мус и ODC были выбраны в качестве функциональных контролей, т.к. гидролиз белка с-Мус протеасомой протекает по классическому убиквитин-зависимому пути [149], в то время как ODC протеолизуется по убиквитин-независимому пути с участием вспомогательного белка антизима [150]. Как и ожидалось, котрансфекция как UbK0, так и E1 siRNA к E1 блокировала протеасомальный гидролиз белка с-Мус и способствовала его накоплению, в то время как протеолиз ODC протеасомой в этих условиях не изменялся по сравнению с контрольной трансфекцией. Более того, в отсутствие полиубиквитинилирования вследствие котрансфекции UbK0 протеолиз ODC протекал существенно быстрее, чем при котрансфекции убиквитином дикого типа, предположительно из-за отсутствия конкуренции с полиубиквитиновыми конъюгатами за взаимодействие с протеасомой. MBP подвергался протеолизу с одинаковой скоростью во всех условиях, что свидетельствует об отсутствии необходимости в модификации MBP убиквитином для его гидролиза протеасомой.

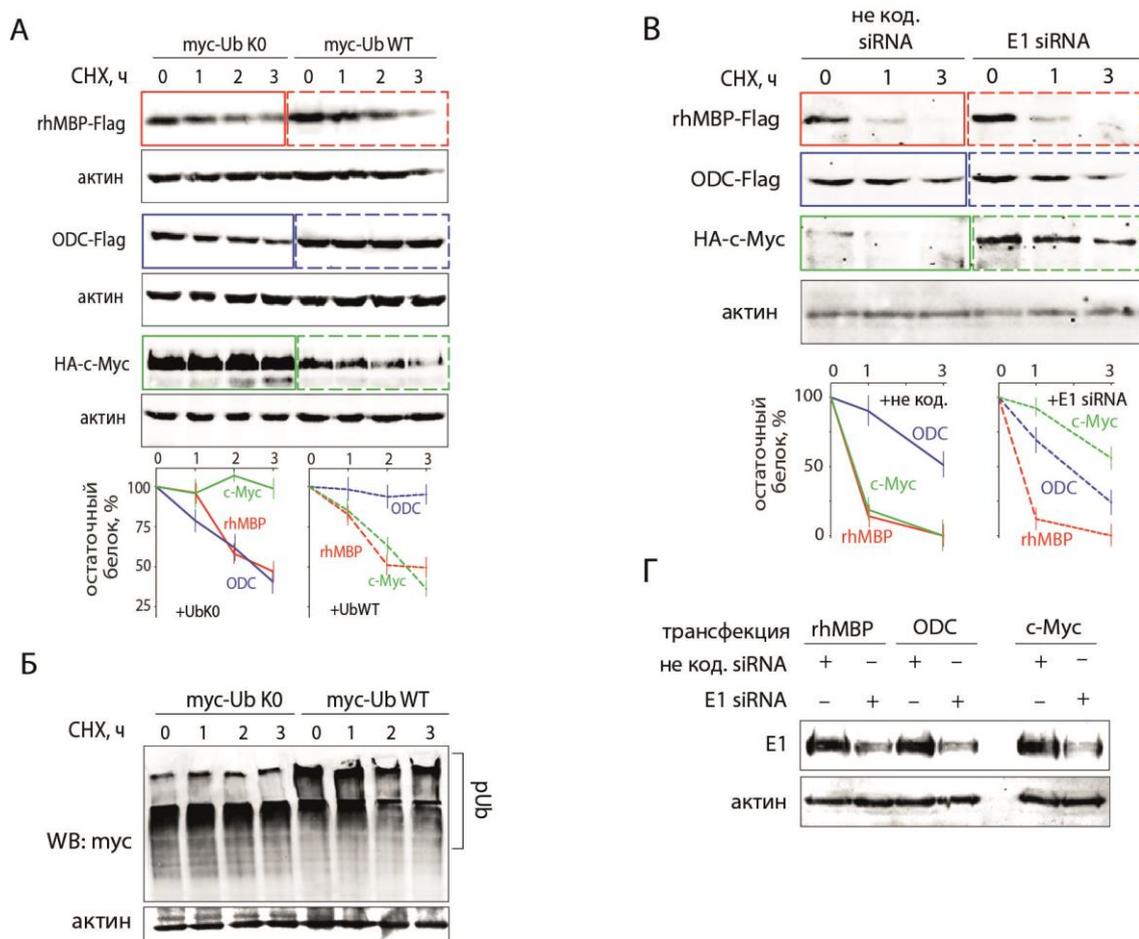


Рисунок 15. А. Вестерн-блоттинг лизатов клеток линии НЕК, трансфицированных генетическими конструкциями, кодирующими вариант убиквитина K0 (UbK0) или убиквитин дикого типа (UbWT), слитных с мус-эпитопом, а также генетическими конструкциями, кодирующими МВР (rhMBP-Flag), с-Мус (HA-c-Мус) или орнитиндекарбоксилазу (ODC-Flag). Здесь и далее приведены различные временные точки обработки клеток циклогексимидом. В качестве контроля процедуры нанесения применяли гибридизацию этой же мембраны с моноклональными антителами к β -актину (актин). Б. Вестерн-блоттинг тех же клеточных лизатов, что и в (А), гибридизация с анти-мус антителом для наблюдения за накоплением и протеолизом полиубиквитиновых конъюгатов. В. Вестерн-блоттинг лизатов клеток линии НЕК, трансфицированных генетическими конструкциями, кодирующими МВР, с-Мус или ODC, а также контрольной siRNA и E1 siRNA. Г. Вестерн-блоттинг тех же клеточных лизатов, что и в (В), гибридизация с антителом к лигазе E1.

Аналогичные эксперименты были проведены на первичной культуре зрелых олигодендроцитов мыши. Олигодендроциты были котрансфицированы генетическими конструкциями, кодирующими белки МВР или с-Мус, вместе с генетическими конструкциями, кодирующими UbK0 или Ub дикого типа. По аналогии с клетками НЕК, в присутствии UbK0 МВР гидролизовался с такой же скоростью или даже несколько быстрее, чем в присутствии убиквитина дикого типа, в то время как подавление полиубиквитулирования блокировало протеолиз белка с-Мус (Рис. 16). Полученные данные свидетельствуют о том, что МВР может быть гидролизован протеасомой по убиквитин-независимому пути.

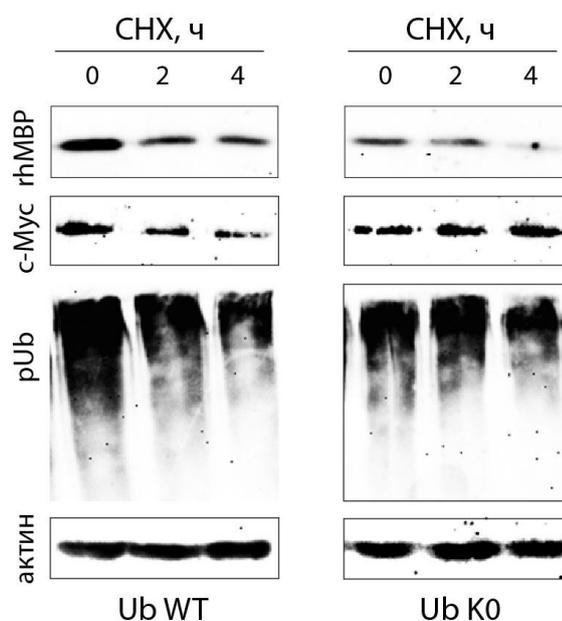


Рисунок 16. Протеолиз MBP в культуре олигодендроцитов. Вестерн-блоттинг лизатов олигодендроцитов, трансфицированных генетическими конструкциями, кодирующими вариант убиквитина K0 (UbK0) или убиквитин дикого типа (UbWT), слитных с мус эпителием, а также генетическими конструкциями, кодирующими белки rhMBP-Flag или HA-c-Myc. pUb. – гибридизация с антителом, специфичным к полиубиквитиновым конъюгатам.

Протеолиз MBP 26S протеасомой *in vitro*

Для анализа компонентов, необходимых для протеасомной деградации MBP *in vitro*, мы использовали систему на основе S100 экстракта из клеток линии HeLa, а также из головного мозга мышей линии BALB/c (**Рис. 17А**). S100 экстракт из головного мозга использовался вследствие того, что экспрессия гипотетически существующей убиквитин-лигазы E3, обладающей сродством к MBP, может быть тканеспецифичной. В результате проведенных экспериментов заметного количества конъюгатов MBP с убиквитином не наблюдалось, хотя, судя по образованию полиубиквитиновых конъюгатов с другими белками, система *in vitro* убиквитинилирования была полностью функциональна. Незначительное количество моно- и диубиквитинилированных производных MBP образовывалось только в присутствии убиквитин-альдегида, ингибитора убиквитин-изопептидаз и других деубиквитинилирующих ферментов [151]. Скорость гидролиза MBP 26S протеасомой *in vitro* в присутствии системы убиквитинилирования не изменялась при добавлении убиквитина (**Рис. 17Б**). Существует вероятность, что в S100 экстракте уже содержится следовое количество молекул убиквитина, достаточное для протекания реакции полиубиквитинилирования. В этой связи, чтобы полностью подавить наращивание убиквитиновой цепи, был проведен аналогичный эксперимент с введением в реакцию избыточного количества убиквитина, метилированного по остаткам лизина и вследствие этого не способного образовывать полиубиквитиновые конъюгаты (**Рис. 17В**).

Скорость гидролиза MBP 26S протеасомой *in vitro* в присутствии метилированного убиквитина была сравнима с таковой в случае немодифицированного убиквитина. В подобных случаях остается теоретическая возможность достаточности моноубиквитинилирования или поли-моноубиквитинилирования [40] для гидролиза субстрата протеасомой. Для проверки данной гипотезы был проведен эксперимент по *in vitro* протеолизу MBP в максимально упрощенной системе: индивидуальная 26S протеасома с очищенным белковым субстратом в присутствии АТФ (Рис. 17Г). 26S протеасому выделяли из головного мозга мыши по методике, включающей осаждение 40% сульфатом аммония, гель-фильтрацию и анионообменную хроматографию, что исключает присутствие каких-либо компонентов системы убиквитинилирования. MBP гидролизовался подобной высокоочищенной 26S протеасомой в отличие от других белков – BSA, тиоредоксина и лизоцима, которые не подвергались протеолизу даже после 24 часов инкубации.

Полученные результаты свидетельствуют, что убиквитин-независимый протеолиз MBP возможен при физиологически значимых концентрациях MBP. По данным литературы [152], накопление MBP в олигодендрocyтах происходит со скоростью 0,2 фмоль в сутки на одну клетку, и достигает динамического равновесия при количестве MBP 1 фмоль на 1 клетку. Известно, что объем зрелого олигодендрocyта составляет примерно 1.7 пл [153]. Если допустить, что в свободном виде в клетке присутствует не более 10% от всего MBP, то его концентрация будет составлять 60 мкМ или меньше, в то время как в проведенных нами экспериментах начальная концентрация MBP составляла 5-20 мкМ.

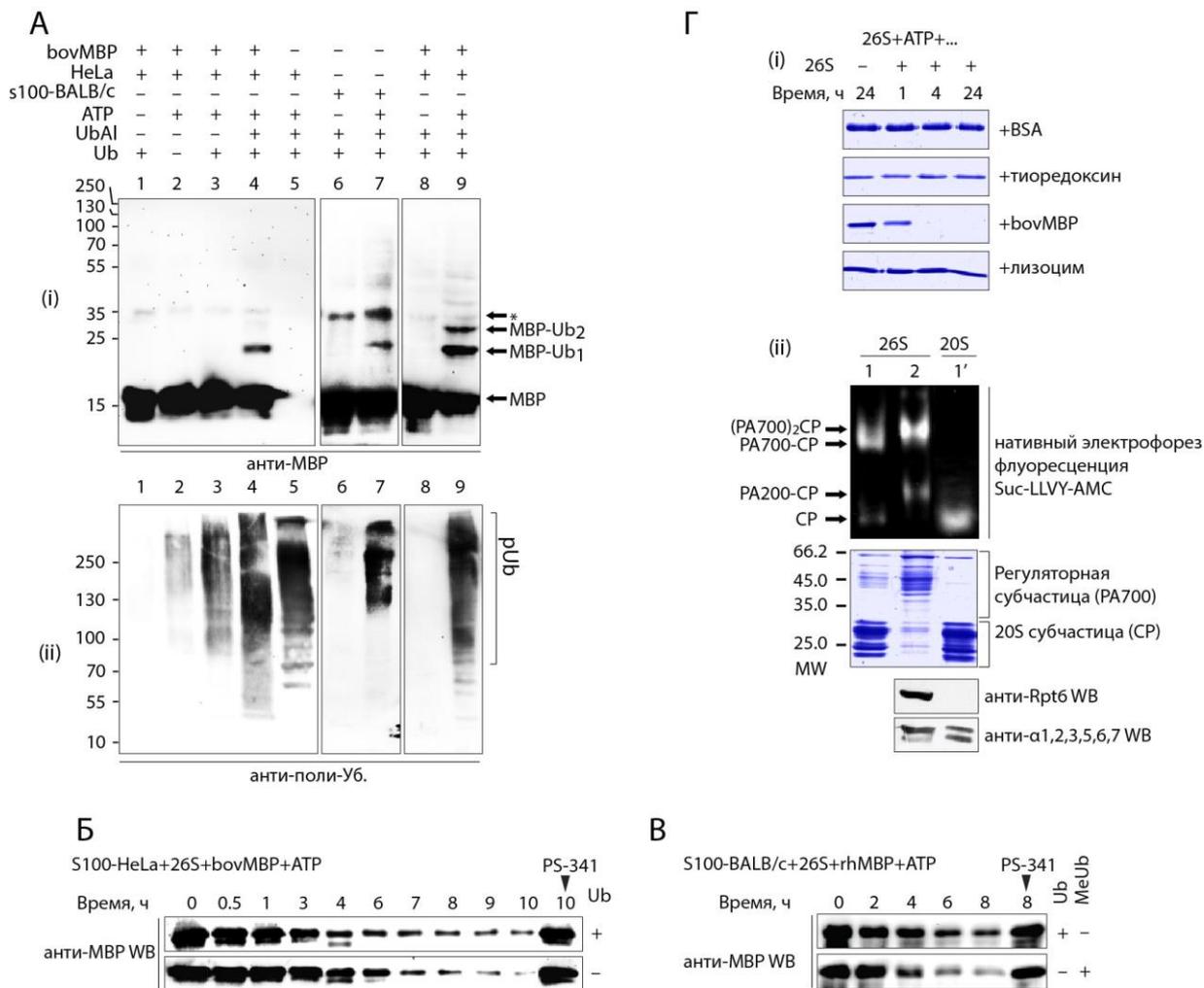


Рисунок 17. А. Вестерн-блоттинг продуктов реакции *in vitro* убиквитинилирования. Состав реакционной смеси для каждого случая обозначен в таблице сверху: bovMBP – MBP из мозга коровы, HeLa – S100-экстракт из клеток линии HeLa, S100-BALB/c – S100-экстракт из головного мозга мышей линии BALB/c, UbAl – убиквитин-альдегид, Ub-убиквитин. Приведена гибридизация с антителами, специфичными к MBP (вверху) и полиубиквитиновым конъюгатам (внизу) Б. Гидролиз MBP 26S протеасомой *in vitro* в присутствии системы убиквитинилирования с добавлением (сверху) без (снизу) убиквитина В. Гидролиз MBP 26S протеасомой *in vitro* в присутствии системы убиквитинилирования с добавлением немодифицированного (Ub) и метилированного (MeUb) убиквитина Г. (i) Электрофоретическое разделение в ПААГ гидролизатов различных белков очищенным препаратом 26S протеасомы (ii) Анализ состава субъединичного состава очищенных препаратов протеасомы, сверху-вниз электрофоретическое разделение в нативном и денатурирующих ПААГ, вестерн-блоттинг с использованием соответствующих антител.

Изучение влияния заряда MBP на эффективность убиквитин-независимого протеолиза

Для того, чтобы попасть в каталитическую полость протеасомы и подвергнуться гидролизу, белок должен связаться с регуляторной 19S субъединицей протеасомы. В случае убиквитинилированных субстратов это взаимодействие происходит путем взаимодействия убиквитиновых конъюгатов с 19S субъединицей. MBP обладает высоким

положительным зарядом и является структурно неупорядоченным белком [154], поэтому можно предположить, что его связывание с другими белками определяется, в основном, электростатическими и/или гидрофобными взаимодействиями. Чтобы получить формы MBP, обладающие меньшим положительным зарядом, MBP был ацетилирован уксусным альдегидом или ферментативно деиминирован с применением пептидиларгинил-деиминазы (PAD) (**Рис. 18**). Об уменьшении положительного заряда полученных форм MBP свидетельствует их сниженная скорость миграции в электрическом поле при проведении электрофореза в неденатурирующих условиях, а также изменившееся время их удерживания на колонке при проведении обращенно-фазовой хроматографии. Скорость гидролиза как ацетилированного, так и деиминированного MBP очищенным препаратом 26S протеасомы существенно замедляется по сравнению с немодифицированным природным MBP, что свидетельствует о том, что возможность убиквитин-независимого протеолиза MBP по-видимому в первую очередь обусловлена большим положительным зарядом этого белка.

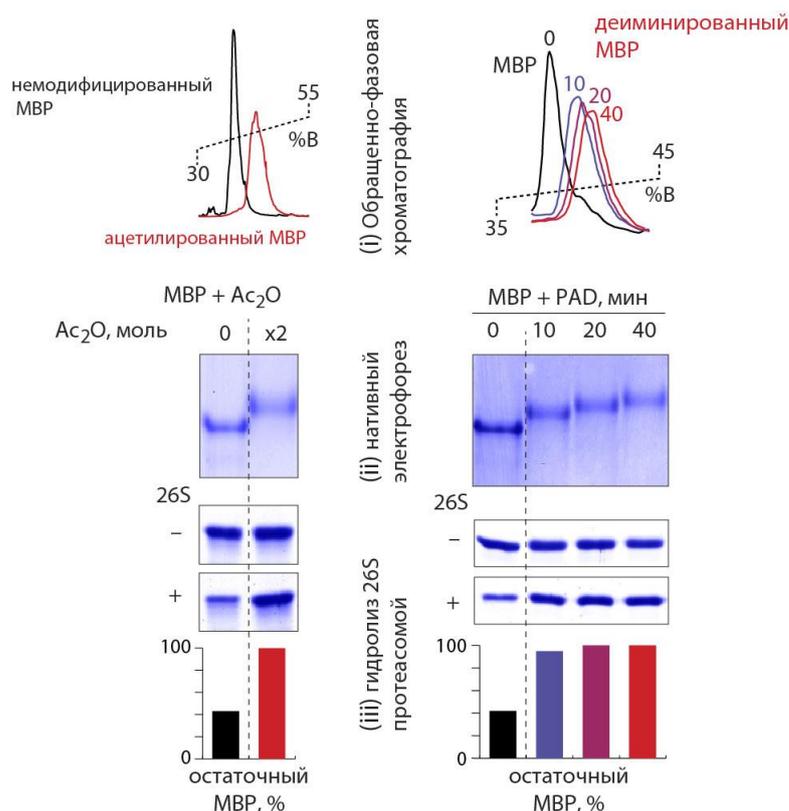


Рисунок 18. Снижение поверхностного положительного заряда MBP путем ацетилирования (слева) и деиминирования (справа) и гидролиз полученных модифицированных форм MBP очищенным препаратом 26S протеасомы. Степень протеолиза определяли электрофоретическим разделением реакционной смеси в ПААГ с последующим денситометрическим анализом.

Другим очевидным способом нейтрализации высокого положительного заряда MBP является образование комплексов MBP с различными белками, которые частично

компенсируют его высокий заряд. Известно, что MBP как *in vitro*, так и *ex vivo* может образовывать комплексы с рядом белков, например актином [155], кальмодулином [156], а также белками, содержащими SH3-домен [157]. Кроме того, логичным представляется, что на скорость гидролиза MBP протеасомой могут влиять белки, похожие на MBP наличием высокого положительного заряда и неупорядоченной структуры, т.к. они могут конкурировать с MBP за взаимодействие с 26S протеасомой.

Таблица 2. Физико-химические свойства проанализированных белков

Белок	Масса, кДа	Изоэлектрическая точка (pI)
MBP	18,3	11,28
Актин	41,8	5,23
GST	23,2	6,28
Убиквитин (Ub)	8,6	7,37
BSA	66,4	5,6
Глатирамера ацетат (GA)	5 - 9	~10,3
Гистон H1.3	22,22	11,02
Тетраубиквитин (Ub ₄)	34,4	6,56
Кальмодулин (CaM)	16,7	4,09
Лизоцим (Lys)	14,3	11,35

В **таблице 2** представлены белки, влияние которых на гидролиз MBP протеасомой было протестировано в эксперименте *in vitro*. Актин и кальмодулин (CaM) способны образовывать комплексы с MBP; глатирамера ацетат (GA) – синтетический полипептид, имеющий структурное сходство с MBP, известное терапевтическое средство против рассеянного склероза [115]; гистон H1.3 по аналогии с MBP обладает положительным зарядом и является структурно неупорядоченным белком [158]; тетраубиквитин (Ub₄) является классическим лигандом регуляторной субчастицы протеасомы [33, 159, 160]. В качестве контрольных были выбраны белки с упорядоченной глобулярной структурой: глутатион-S-трансфераза (GST) и BSA, обладающие слабым отрицательным зарядом, и положительно заряженный лизоцим. Скорость гидролиза MBP протеасомой в присутствии различных концентраций выбранных белков определяли электрофоретическим разделением реакционных смесей в ПААГ с последующим денситометрическим анализом (**Рис. 19А и 19Б**). Ни тетраубиквитин, взаимодействующий с UIM-доменами субъединицы протеасомы Rpn10 [159], ни моноубиквитин, взаимодействующий с N-концевой частью субъединицы Rpn13 [33] не влияли на скорость гидролиза MBP

Полученные данные были подтверждены и в случае внутриклеточного протеолиза МВР протеасомой. Так, протеолиз МВР замедлялся в клетках линии НЕК при котрансфекции генетическими конструкциями, кодирующими МВР и гистон Н1.3. Аналогично, добавление GA в культуральную среду также замедляло протеолиз МВР (Рис. 20).

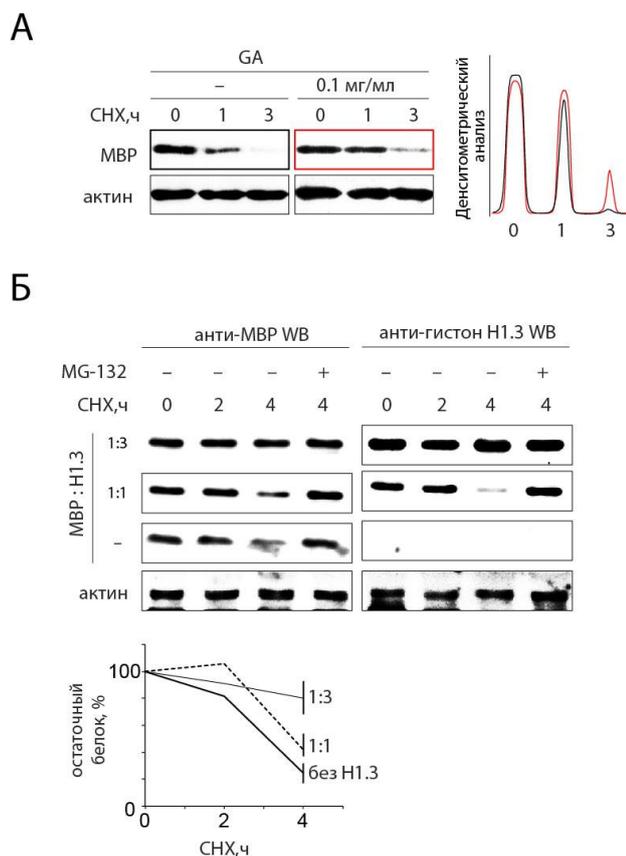


Рисунок 20. А. Вестерн-блоттинг анализ лизатов клеток линии НЕК, трансфицированных генетической конструкцией, кодирующей МВР. Анализ скорости протеолиза с использованием циклогексимида в присутствии и в отсутствии 0.1 мг/мл GA в клеточной среде. **Б.** Вестерн-блоттинг лизатов клеток линии НЕК, трансфицированных генетическими конструкциями, кодирующими МВР, гистон Н1.3 и GFP. GFP использовался в качестве балластной ДНК для выравнивания общего количества трансфицируемой ДНК. Анализ скорости протеолиза с использованием циклогексимида. Внизу представлены результаты денситометрического анализа.

Известно, что МВР взаимодействует с актином не только *in vitro*, но и в живой клетке [161], кроме того, он способен связываться с кальмодулином, ассоциированным с ионами кальция [156]. Кальмодулин в клетке взаимодействует с большим количеством белков, включая киназу легких цепей миозина, кальцинейрин, NO-синтазу и фосфодиэстеразу, при этом концентрация свободного Ca^{2+} - кальмодулина составляет всего 50-60 нМ и явно недостаточна для защиты МВР от гидролиза протеасомой [162, 163]. Физиологическая концентрация актина, способного к взаимодействию с МВР, значительно больше, т.к. МВР способен взаимодействовать не только с мономерным актином, но и с актиновыми филаментами. Однако, как показывают проведенные в

данной работе эксперименты на культурах клеток млекопитающих, такой концентрации тем не менее недостаточно для того, чтобы полностью защитить МВР от гидролиза протеасомой в живой клетке. Крайне маловероятно, что защита МВР от гидролиза протеасомой вносит свой вклад в терапевтическое действие ГА, т.к. этот полипептид плохо проникает через ГЭБ и тем более через мембрану олигодендроцитов [164]

Анализ физиологической значимости деградации МВР иммунопротеасомой

Изучение баланса протеасома-иммунопротеасома в ЦНС при развитии ЕАЕ.

Известно, что 26S протеасома может существовать в двух основных состояниях, в виде так называемой конститутивной и иммунной протеасомы (иммунопротеасома). Смещение баланса в сторону последней происходит под действием интерферона-гамма. Как правило, при расщеплении белков иммунопротеасомой за счет измененной специфичности каталитических субъединиц образуется значительно большее количество пептидов, С-конец которых благоприятствует презентации на МНС I, чем при расщеплении тех же белков стандартной протеасомой [19, 23]. Рассеянный склероз и ЕАЕ характеризуются развитием воспаления в ЦНС, что сопровождается повышением уровня провоспалительных цитокинов, в том числе интерферона-гамма [165]. Поскольку, согласно нашим данным, гидролиз МВР не контролируется системой ферментов убиквитинилирования, качественный и количественный спектр пептидных фрагментов МВР, презентированных на МНС I, практически полностью зависит от состава каталитических субъединиц протеасомы.

Чтобы выяснить, как меняется баланс конститутивной и иммуннопротеасомы в ЦНС при развитии аутоиммунной патологии, мы исследовали содержание субъединиц конститутивной протеасомы $\beta 1/\beta 5$, и соответствующих им иммуносубъединиц $\beta 1i/\beta 5i$ в различных отделах головного мозга контрольных мышей линии BALB/c, мышей линии SJL, предрасположенных к развитию ЕАЕ, и мышей линии SJL, развивающих ЕАЕ вследствие иммунизации (**Рис. 21А**). Выяснилось, что содержание иммуносубъединиц протеасомы во всех отделах головного мозга значительно повышается у мышей линии SJL при развитии ЕАЕ. Кроме того, статистически значимое увеличение содержания иммуносубъединиц протеасомы в коре, стриатуме и медиабазальном гипоталамусе (МБГ) наблюдалось у неиммунизированных мышей линии SJL (Рис. 10Б) в сравнении с мышами линии BALB/c. Интересно отметить, что иммунизация мышей линии BALB/c приводила к

увеличению содержания иммунопротеасомы в мозжечке и стволе мозга – отделах, характеризующихся повышенной проницаемостью ГЭБ (Рис. 10В). Таким образом, как у мышей линии SJL, так и у мышей линии BALB/c в результате иммунизации увеличивалось количество иммунопротеасомы в ЦНС, но только у мышей линии SJL иммуносубъединицы протеасомы появлялись в отделах головного мозга, в норме защищенных ГЭБ.

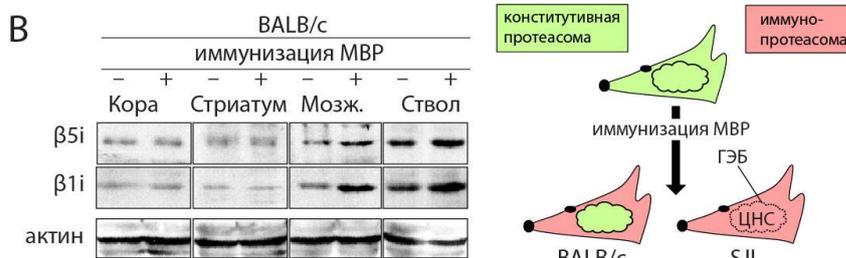
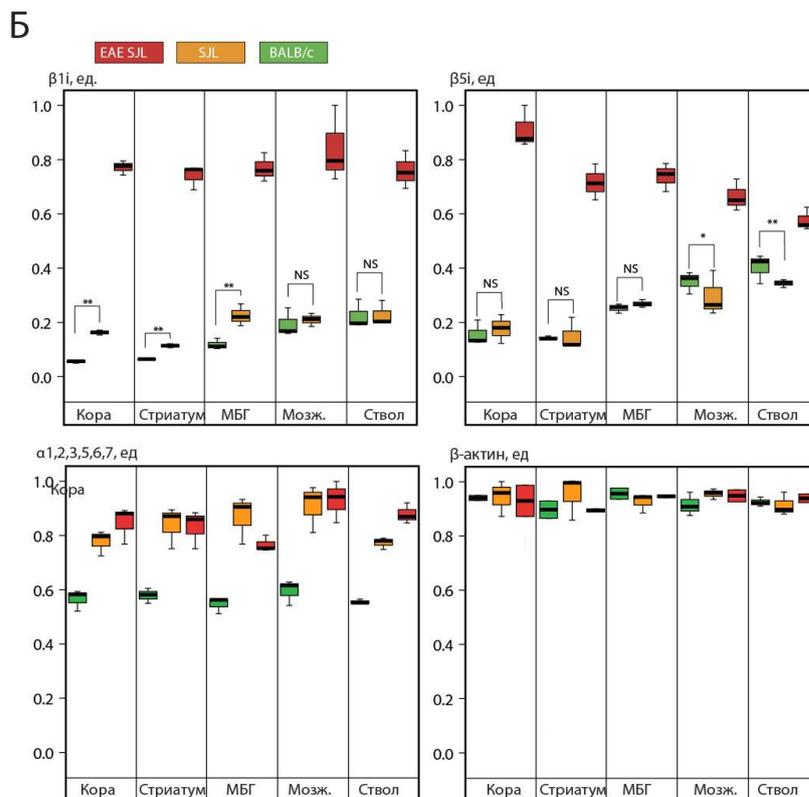
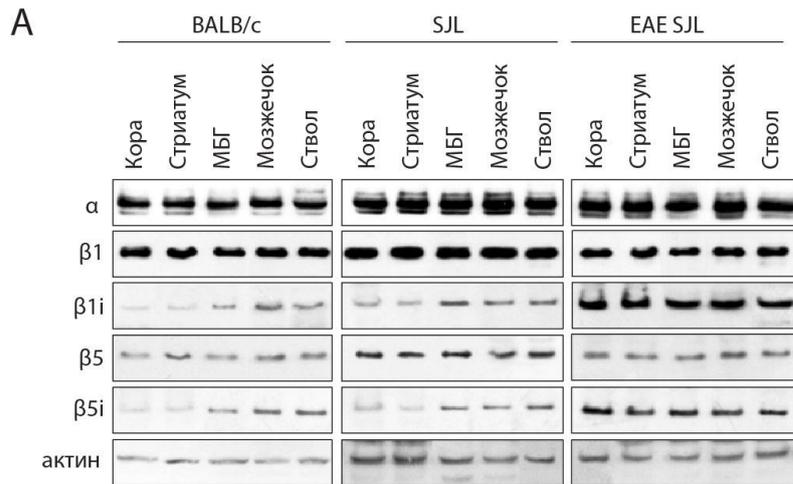


Рисунок 21. А. Вестерн-блоттинг гомогенатов различных отделов головного мозга мышей на предмет наличия субъединиц конститутивной ($\beta 1/\beta 5$) или иммунной протеасомы ($\beta 1i/\beta 5i$). МБГ – медиабазальный гипоталамус. **Б.** Денситометрический анализ количества субъединиц протеасомы и β -актина как контроля нанесения по результатам вестерн-блоттинга. ** - статистически значимое различие. **В.** Вестерн-блоттинг гомогенатов различных отделов головного мозга мышей линии BALB/c, иммунизированных и не иммунизированных МВР на предмет наличия субъединиц иммунной протеасомы ($\beta 1i/\beta 5i$)

Локализация иммуносубъединиц иммунопротеасомы в структурах головного мозга на клеточном уровне

Для локализации иммунопротеасомы в ЦНС нами было проведено иммуногистохимическое исследование срезов головного мозга экспериментальных мышей. У мышей, больных ЕАЕ, повышение экспрессии субъединицы $\beta 1i$ в тканях ЦНС коррелирует с пониженной окраской на NeuN (**Рис. 22А и 22Б**), что свидетельствует о апоптотических процессах в нейронах [166]. Данное наблюдение прямо указывает на связь между нейродегенерацией и активностью иммунопротеасомы. Интересно, что дальнейшее изучение локализации $\beta 1i$ и $\beta 5i$ в ЦНС мышей с ЕАЕ, показало присутствие этих иммуносубъединиц в различных типах клеток (**Рис. 22В**). Детальный гистохимический анализ продемонстрировал, что $\beta 1i$ колокализуется с MBP, маркером олигодендроцитов, в то время как $\beta 5i$ колокализуется с CD3, маркером Т-лимфоцитов (**Рис. 22Г**). Таким образом, $\beta 1i$ накапливается в резидентных клетках ЦНС, а $\beta 5i$ скорее всего привносится в ЦНС извне через поврежденный ГЭБ.

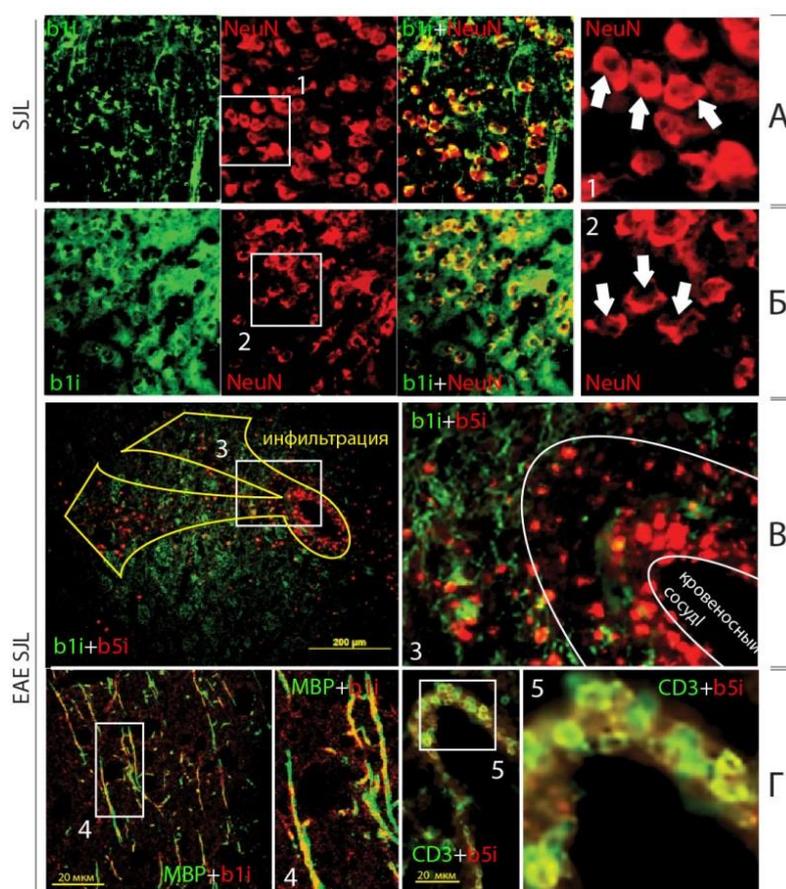


Рисунок 22. Иммуногистохимический анализ срезов головного мозга неиммунизированных мышей линии SJL (А) и мышей линии SJL, развивающих ЕАЕ (Б,Б',Г).

Важно отметить, что в первичной культуре зрелых олигодендроцитов также наблюдалось увеличение количества $\beta 1i$ при воздействии интерферона-гамма (**Рис. 23**).

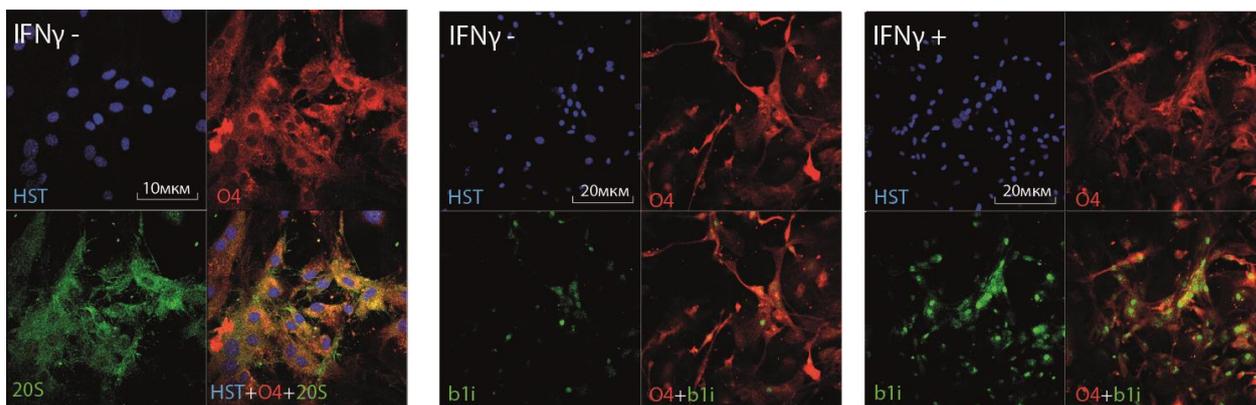


Рисунок 23. Иммуноцитохимический анализ культуры зрелых олигодендроцитов, обработанных (IFN γ +) и не обработанных (IFN γ -) интерфероном-гамма. HST – ядерный краситель Hoechst 33342, O4 – антитело, специфичное к O4-маркеру олигодендроцитов, 20S – анти- α субъединицы протеасомы, b1i – анти- β 1i.

Сравнение спектров деградации МВР конститутивной протеасомой и иммунопротеасомой

Исходя из полученных данных, стало очевидным, что убиквитин-независимый протеолиз МВР протеасомами из ЦНС здоровых мышей и мышей с ЕАЕ может приводить к различным спектрам пептидных фрагментов. Чтобы проанализировать продукты гидролиза МВР протеасомой методом масс-спектрометрии, на первом этапе необходимо было детализировать посттрансляционные модификации МВР, выделенного из головного мозга коровы, который планировалось использовать в качестве субстрата для протеолиза. Методом масс-спектрологии ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье с источником ионизации электроспрей (ESI-FTICR MS) было установлено, что МВР полностью ацетилирован и значительное количество белка монометиловано. Также МВР в пределах 10% от суммарного количества белка был диметилован, фосфорилирован и окислен по остаткам метионина. Сайты модификаций были определены методом протеолитической фрагментации МВР и анализом полученных пептидов методом масс-спектрометрии с жидкостной хроматографией. Таким образом, основными посттрансляционными модификациями МВР являются ацетилирование N-конца, моно- и диметилование остатков аргинина-106, фосфорилирование треонина-97, окисление метионина-19 и метионина-166 (**Рис. 24**).

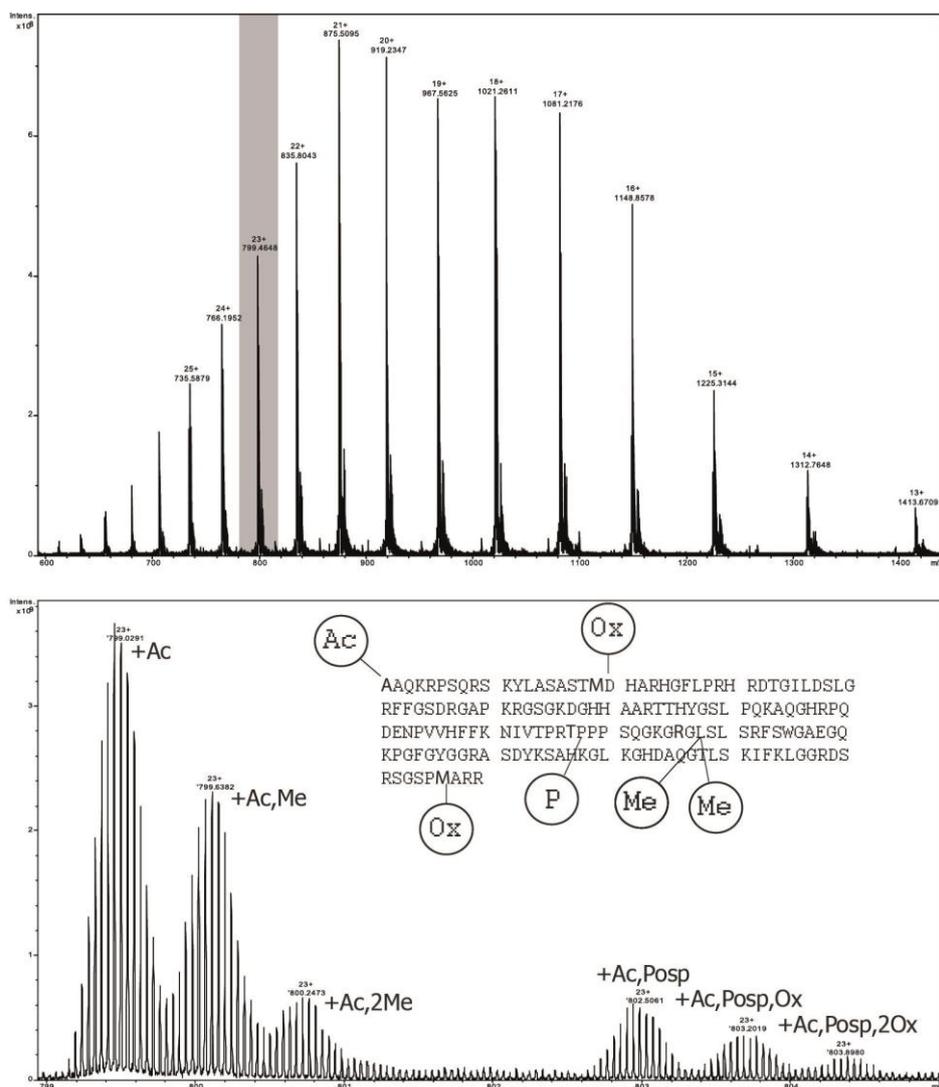


Рисунок 24. Масс-спектрограмма мультитарядных ионов высокоочищенного МВР (вверху), подробно показан пик с зарядом +23 (внизу) и аминокислотная последовательность МВР с отмеченными на ней идентифицированными посттрансляционными модификациями.

Процесс ферментативной деградации основного белка миелина может протекать по двум основным путям – с помощью протеасомы и протеаз. Чтобы выяснить, как отличается гидролиз МВР протеасомой в норме и патологии, мы провели *in vitro* гидролиз МВР протеасомами из головного мозга здоровых мышей и мышей, развивающих ЕАЕ. Для оценки качественного состава образующихся пептидов дополнительно нами был проведен гидролиз МВР рядом протеолитических ферментов, которые, как полагают, ассоциированы с развитием рассеянного склероза [167]: матричной металлопротеиназой 3, матричной металлопротеиназой 9, μ -кальпаином и трипсином. Продукты гидролиза анализировали методом тандем-масс-спектрометрии. Паттерны гидролиза протеасомой из головного мозга мышей значительно отличались от паттернов гидролиза протеолитическими ферментами (Рис. 25А), а также от изученных ранее [94, 144] паттернов гидролиза каталитическими антителами. Под действием протеолитических

ферментов в основном образовывались пептиды, относящиеся к фрагменту MBP₁₁₀₋₁₃₀, в то время как в гидролизатах протеасомой обнаруживались пептиды, относимые практически ко всей аминокислотной последовательности MBP. Из всех протестированных протеолитических ферментов кальпаин наиболее близок к протеасоме по специфичности протеолиза MBP. Особо необходимо отметить, что спектры пептидов, образуемые под действием протеасомы из головного мозга здоровых и развивающих ЕАЕ мышей, заметно отличаются друг от друга. Пептиды, полученные под действием протеасомы из головного мозга развивающих ЕАЕ мышей, существенно перекрывались с основными Т-клеточными эпитопами MBP [167].

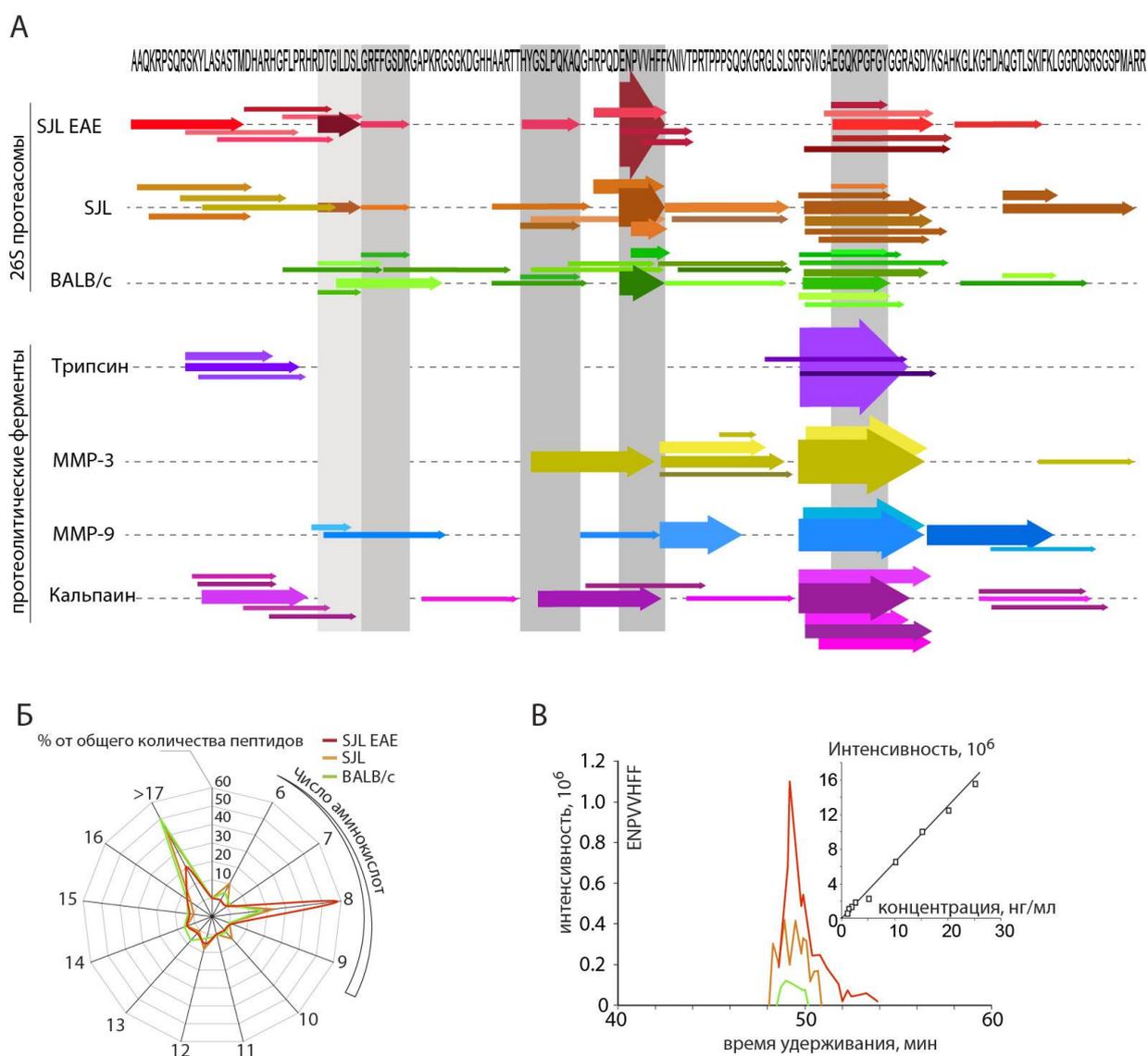


Рисунок 25. А. Паттерны деградации MBP протеасомами из головного мозга мышей, а также рядом протеаз, ассоциированных с развитием аутоиммунных патологий ЦНС. Сверху представлена аминокислотная последовательность MBP, каждая стрелка соответствует пептидному фрагменту этой аминокислотной последовательности, детектируемому масс-спектрометрически. Толщина стрелок соответствует количеству того или иного пептида по результатам безметочного (label-free) анализа. **Б.** Распределение по длинам пептидов MBP, полученных под действием протеасомы из головного мозга мышей BALB/c, SJL и ЕАЕ-SJL. **В.** Безметочный анализ количества пептида ENPVVHFF (MBP₈₃₋₉₀) в различных протеасомных гидролизатах.

Анализ распределения образуемых фрагментов МВР по длине показывает, что максимальное количество пептидов длиной 8 аминокислотных остатков, оптимальной для презентации на МНС I, получается под действием протеасомы из головного мозга мышей, развивающих ЕАЕ (**Рис. 25Б**). Безметочный анализ количества пептида МВР₈₃₋₉₀ [ENPVVHFF] в протеасомных гидролизатах показал, что под действием протеасомы из головного мозга мышей с ЕАЕ по сравнению со здоровыми мышами количество данного пептида возрастает в 10 раз (**Рис. 25В**).

Проведенный безметочный анализ явно продемонстрировал необходимость строго количественного сравнения относительного содержания пептидов МВР в протеасомных гидролизатах. Для этого был разработан метод, основанный на применении воды, содержащей нуклид кислорода ¹⁸O (**Рис. 26**). При каждом элементарном гидролитическом акте разрушения пептидной связи под действием протеасомы на С-конец образующегося пептида встраивается атом кислорода из молекулы воды. Протеолиз МВР протеасомой из головного мозга мышей линии BALB/c проводили в воде, содержащей ¹⁸O, в то время как гидролиз протеасомой из мышей SJL проводили в обычной воде, содержащей ¹⁶O. Таким образом, пептиды, полученные при гидролизе МВР соответствующими протеасомами, будут отличаться друг от друга на 2 единицы молекулярной массы, но обладать в точности одинаковым временем удерживания на обращенно-фазовом сорбенте и одинаковой эффективностью ионизации. Количество протеасомы, необходимой для гидролиза, выравнивали исходя из ее активности по пептидному субстрату Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC.

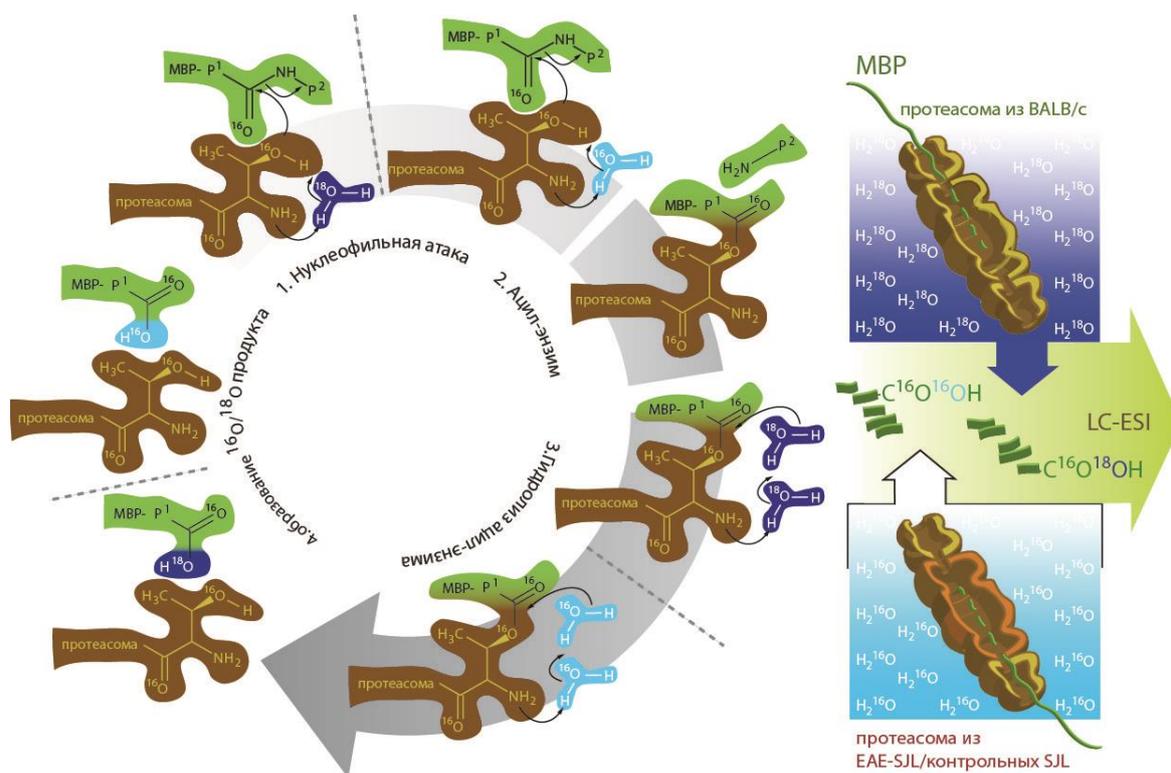


Рисунок 26. Схематичное изображение метода количественного анализа паттернов деградации MBP протеасомой с использованием воды, содержащей нуклид кислорода ^{18}O .

Для компенсации природного изотопного распределения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ гидролизаты MBP двумя типами протеасомы смешивали в нескольких разных молярных соотношениях. Это позволило осуществить количественный анализ образования более чем 250 фрагментов MBP под действием протеасом из мышей линий BALB/c и SJL с и без EAE (**Рис. 27**). Из этого количества 5 пептидов по структуре подходили для загрузки на MHC I. Количество двух из этих пептидов, DTGILDSL (MBP₃₃₋₄₀) and ENPVVHFF (MBP₈₃₋₉₀) увеличивалось в 10 раз при гидролизе MBP протеасомой из мозга EAE SJL в сравнении с гидролизом MBP протеасомой из мозга мышей линии BALB/c. В отличие от других проанализированных пептидов, согласно результатам MS2 спектра, MBP₈₃₋₉₀ содержал на C-конце два атома ^{18}O вместо одного. Предположительно, это результат двойной реакции гидролиза, которая становится возможной в результате повышенного сродства этого пептида к каталитической полости протеасомы.

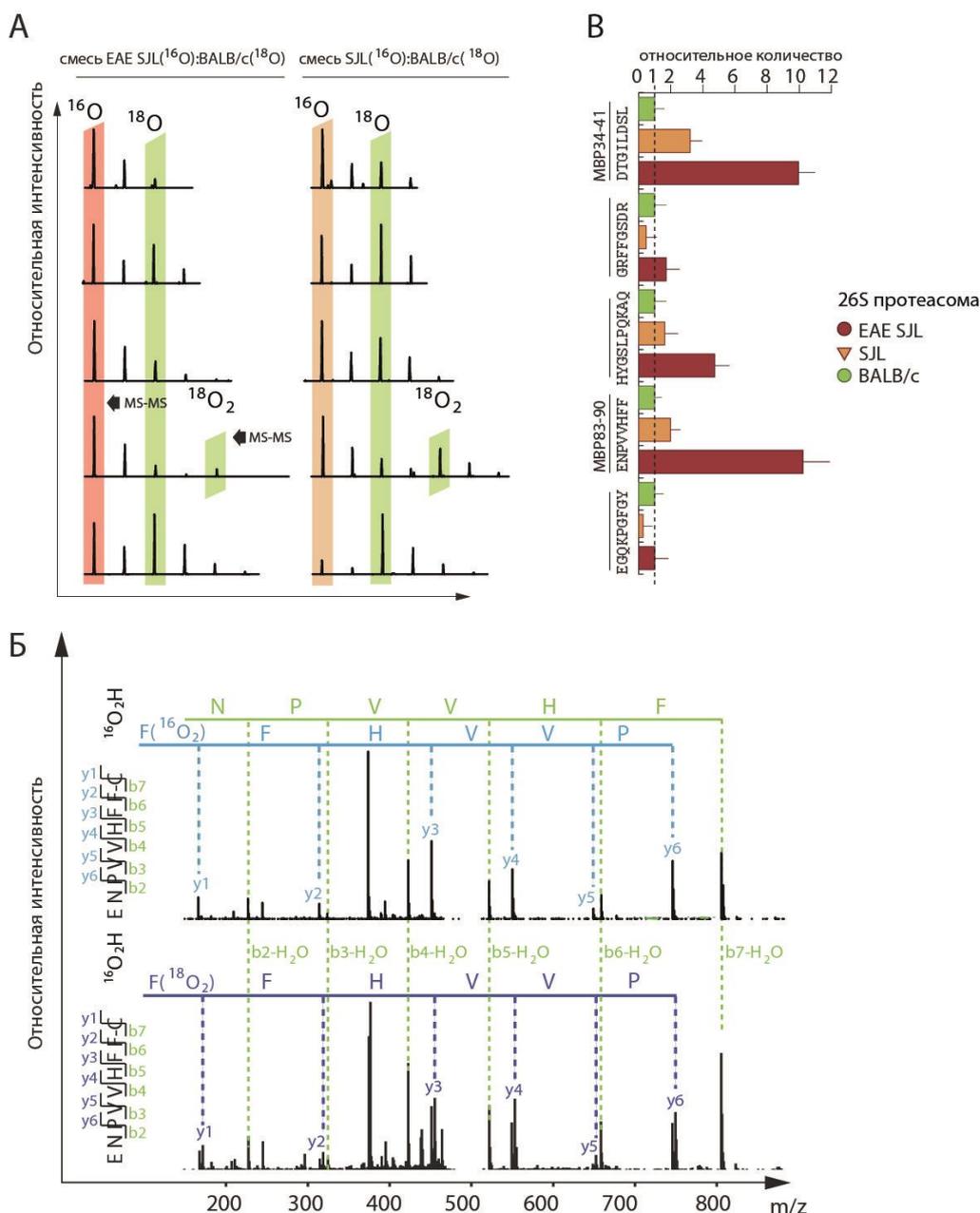


Рисунок 27. А. Пример участка масс-спектра, полученного при анализе с использованием воды, содержащей нуклид кислорода ^{18}O . Б MS-MS спектр анализ пептидов ENPVVHFF, полученных под действием протеасомы в воде, содержащей ^{16}O и в воде, содержащей ^{18}O . В. Количественная оценка некоторых пептидов MBP, образующихся под действием протеасом. Данные пептиды которые по длине подходят для загрузки на МНС I.

Исследование образования пептида MBP₈₃₋₉₀ под действием иммунопротеасомы субъединичного состава $\beta 1^{\text{high}} \beta 5^{\text{low}}$

Пептид MBP₈₃₋₉₀ является частью энцефалитогенного фрагмента MBP, поэтому мы более детально изучили его образование при действии различных типов протеасомы на MBP. Для этого был синтезирован химически идентичный пептид с С-концевым фенилаланином, все атомы углерода и азота которого обладали массовыми числами 15 и 13, соответственно. Результаты количественного анализа с использованием подобного внутреннего стандарта полностью подтвердили ранее полученные данные. Скорость

образования пептида MBP₈₃₋₉₀, рассчитанная исходя из известного количества внутреннего стандарта, заранее введенного в гидролизат MBP протеасомами, оказалась до 8 раз больше при гидролизе MBP протеасомой из мозга EAE SJL, чем при гидролизе протеасомой из мозга неиммунизированных мышей линии SJL и мышей линии BALB/c (Рис. 28). За 24 часа под действием протеасомы из головного мозга EAE-SJL образуется порядка 0.83 моль пептида ENPVVHFF на 1 моль изначального MBP.

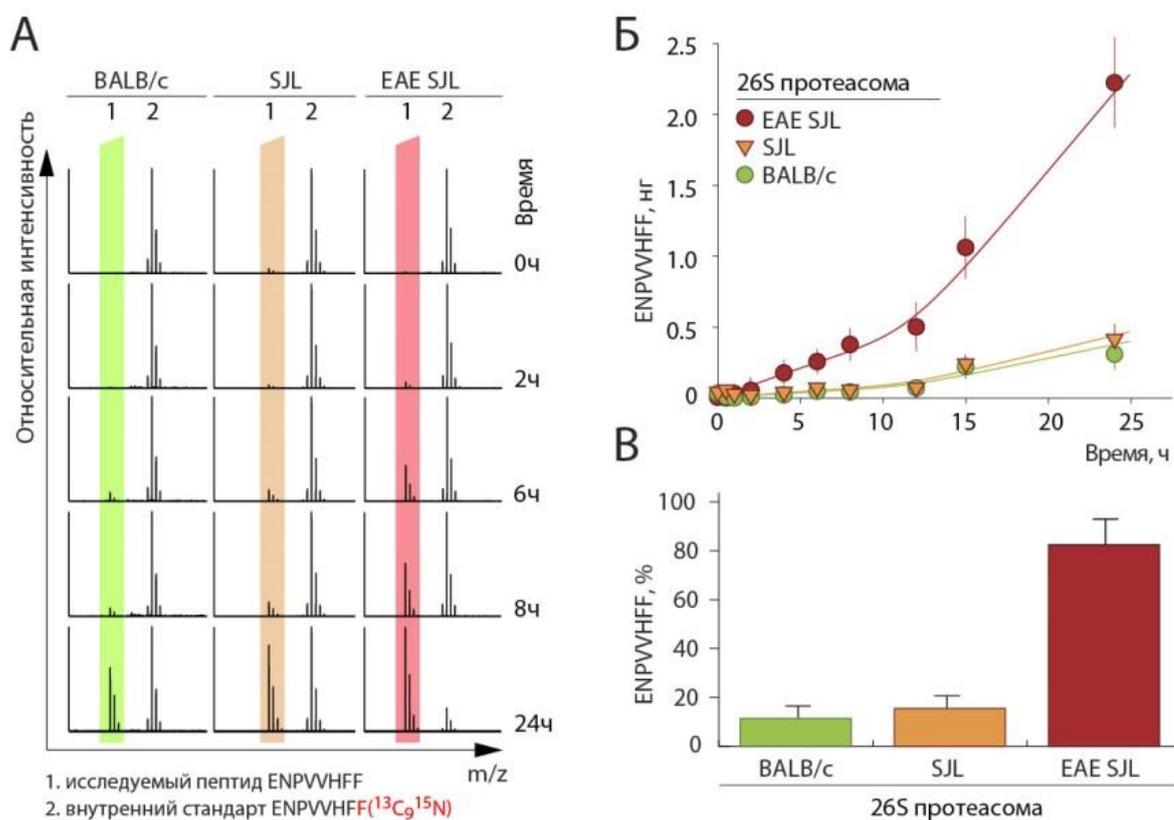


Рисунок 28. Определение скорости образования пептида ENPVVHFF с использованием синтетического изотопно-меченного аналога. Масс-спектр (А), зависимость количества образовавшегося пептида от времени протеолиза (Б) и количество ENPVVHFF, образовавшегося за 24 часа гидролиза MBP протеасомой из головного мозга мышей BALB/c, SJL и EAE SJL (в процентах от количества исходного MBP) (В).

Свидетельство презентации пептида MBP₈₃₋₉₀ на МНС I и анализ цитотоксического действия MBP₈₃₋₉₀-специфических Т-клеток на олигодендроциты.

Возможность презентации того или иного пептида на поверхности клетки в составе МНС I обусловлена структурой пептид-связывающей области молекулы МНС I. Из литературы известно [168], что пептид DENPVVHFF (MBP₈₂₋₉₀) способен презентироваться на МНС I мыши гаплотипа H-2K^k. Однако, мыши линии SJL имеют гаплотип H-2^s, поэтому нельзя с уверенностью сказать, будет ли генерируемый иммунопротеасомой пептид MBP₈₃₋₉₀ презентироваться на МНС I и вносить свой вклад в развитие EAE у мышей линии SJL. Каждый тип молекулы МНС I взаимодействует с определенным набором пептидов, имеющих определенные аминокислотные остатки в так

называемых «якорных сайтах», которые являются индивидуальной характеристикой каждого отдельно взятого МНС I. В терминах девятичленного пептида якорные сайты могут находиться в позициях P2-P9 или P5/6-P8. К нашему сожалению, отсутствуют точные литературные данные о том, какие именно аминокислотные остатки необходимы для связывания H-2K^s. Известно только, что на H-2K^s могут успешно презентироваться пептиды FNFTAPFI, QTSYTSPTI и SNDDASVDFV [169]. Выравнивая аминокислотные последовательности этих пептидов (**Рис. 29А**), можно сделать предварительный вывод о том, что якорными сайтами для связывания с H-2K^s являются позиции P5/6-P8. Для связывания с МНС I аминокислотные остатки валина, серина и треонина являются взаимозаменяемыми [170], поэтому с большой вероятностью пептид ENPVVHFF будет связываться с H-2K^s.

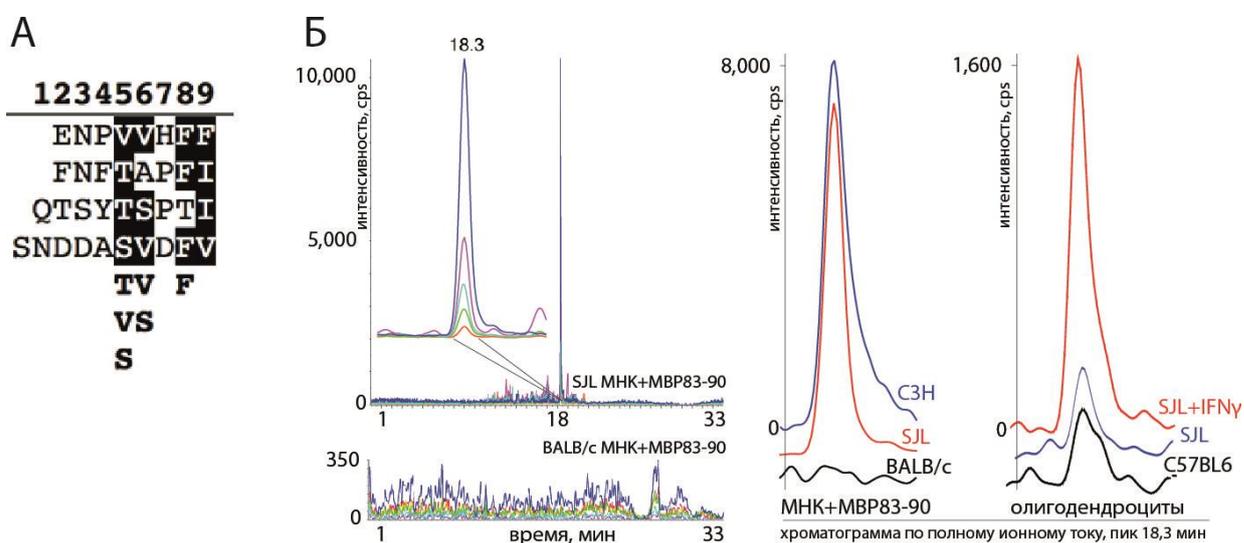


Рисунок 29. А. Сравнение аминокислотных последовательностей пептидов, для которых показана презентация на МНС I гаплотипа H-2K^s и изучаемого в данной работе пептида ENPVVHFF. Б. Анализ связывания пептида ENPVVHFF с МНС I мыши методом MRM масс-спектрометрии. Хроматограммы по полному ионному току (слева) и пик, соответствующий данному пептиду (время удерживания 18,3 мин) для 5 MRM транзиций (справа).

Для экспериментального подтверждения данного предположения, нами были выделены мононуклеарные клетки из периферической крови мышей линии SJL, интересующего нас гаплотипа H-2^s, С3Н (H-2^k) – в качестве положительного контроля и BALB/c (H-2^d) в качестве отрицательного контроля, т.к. якорные сайты для H-2^d известны [171] и ENPVVHFF для связывания с H-2^d по структуре очевидно не подходит. Мононуклеарные клетки инкубировали с синтетическим пептидом ENPVVHFF в течение 5 часов, тщательно отмывали, лизировали и определяли содержание ENPVVHFF с методом количественной масс-спектрометрии с мониторингом множественных реакций (MRM) (**Рис. 29Б**). В результате анализа исследуемый пептид был обнаружен в образцах

клеток с гаплотипами H-2^k и H-2^s, но не обнаружен в клетках с гаплотипом H-2^d. Методом MRM также было показано, что количество ENPVVHFF, образованного из эндогенного MBP, увеличивается в культуре олигодендроцитов при обработке интерфероном-гамма, но в данном случае применяемая методика не позволяет отличить пептид, находящийся в цитоплазме, от пептида, презентированного на MHC I.

На следующем этапе работы из мышей линии SJL методом активации *ex vivo* были получены цитотоксические Т-лимфоциты, специфичные к ENPVVHFF. В качестве контроля использовались цитотоксические Т-лимфоциты, специфичные к пептиду вируса энцефалита Тэйлера FNFTAPFI. Цитотоксические ENPVVHFF-реактивные Т-лимфоциты специфически лизировали олигодендроциты, полученные из мышей линии SJL, при этом этот процесс ингибировался анти-MHC I антителами и его эффективность значительно увеличивалась в случае олигодендроцитов, обработанных интерфероном-гамма (Рис. 30).

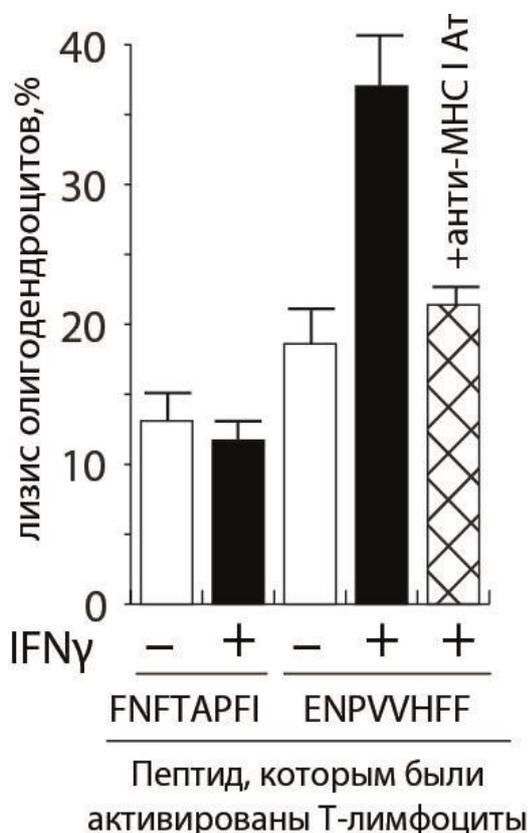


Рисунок 30. Лизис олигодендроцитов, обработанных (IFN γ +) и не обработанных (IFN γ -) интерфероном-гамма, цитотоксическими Т-лимфоцитами, специфичными к пептиду MBP₈₃₋₉₀ [ENPVVHFF] и контрольному пептиду [FNFTAPFI].

На основании полученных данных можно сделать вывод, что при развитии ЕАЕ меняется состав каталитических субъединиц протеасомы, находящейся в ЦНС, что приводит к изменению ее субстратной специфичности и паттернов деградации MBP. Замещение $\beta 1$ на $\beta 1i$ приводит к увеличению химотрипсин-подобной активности [172] и

снижению каспазоподобной активности [173]. Благодаря увеличению химотрипсин-подобной активности протеасомы образуются пептиды с гидрофобным С-концом, наличие которого предпочтительно для связывания с МНС I [174], в то время как каспазоподобная активность может приводить к разрушению некоторых Т-клеточных эпитопов [28]. В олигодендроцитах присутствует достаточно большое количество иммуносубъединицы $\beta 1i$, что создает условия для процессинга и презентации аутоантигенов, приводящей к активации специфичных к нейроантигенам Т-клеток и дальнейшему прогрессу аутоиммунной патологии. Недавние исследования показали, что наличие определенной мутации в гене, кодирующем $\beta 1i$ субъединицу иммунопротеасомы, влияет на процессинг МВР, а также снижает риск развития рассеянного склероза [112]. Этот факт, наряду с полученными в данной работе результатами, также свидетельствует о патогенной роли $\beta 1i$ субъединицы иммунопротеасомы в развитии аутоиммунных патологий ЦНС.

Подходы к направленному подавлению гидролиза МВР протеасомой для терапии ЕАЕ

Как показали результаты предыдущих экспериментов, протеолиз МВР иммунопротеасомой может быть одним из этапов CTL-опосредованного разрушения миелиновой оболочки нервных волокон и развития аутоиммунных патологий ЦНС. Если заблокировать этот процесс, то это, возможно, остановит или замедлит аутоиммунную демиелинизацию. Поэтому следующим этапом работы был анализ различных способов блокирования процесса протеолиза МВР протеасомой в качестве потенциальной возможности терапии аутоиммунных патологий ЦНС. Продемонстрированное выше замедление гидролиза МВР протеасомой при снижении положительного заряда белка сложно реализуемо *in vivo*, т.к. известно, что уменьшение его положительного заряда приведет к изменению структуры мембраны олигодендроцитов [175] что является губительным для миелиновых оболочек нервных волокон. Поскольку протеасома участвует во множестве процессов, включая удаление отслуживших и дефектных белков и регуляцию клеточного цикла, неспецифическое блокирование активности протеасомы является нежелательным. Гораздо более перспективным в качестве терапевтической мишени при ЕАЕ видится специфическое блокирование иммунопротеасомы.

Использование малых интерферирующих РНК

Подавление экспрессии иммуносубъединиц протеасомы с помощью соответствующих siRNA является способом воздействия на процесс протеолиза МВР иммунопротеасомой. Для оценки эффективности данного подхода в клетки линии HeLa,

предварительно обработанные интерфероном-гамма, были трансфицированы siRNA к субъединицам иммунопротеасомы $\beta 1i$ и $\beta 5i$, либо некодирующая siRNA в качестве контроля, а затем была трансфицирована генетическая конструкция, кодирующая MBP (Рис. 31). Проведение предварительной трансфекции клеточной культуры siRNA к иммуносубъединицам протеасомы $\beta 1i$ и $\beta 5i$ в сравнении с контрольной siRNA не только понижало уровень экспрессии соответствующих иммуносубъединиц, но и ингибировало внутриклеточный протеолиз MBP. К сожалению, ингибирование протеолиза MBP путем введения малых интерферирующих РНК к иммуносубъединицам протеасомы было явно недостаточно эффективным для применения в качестве метода терапии EAE *in vivo*.

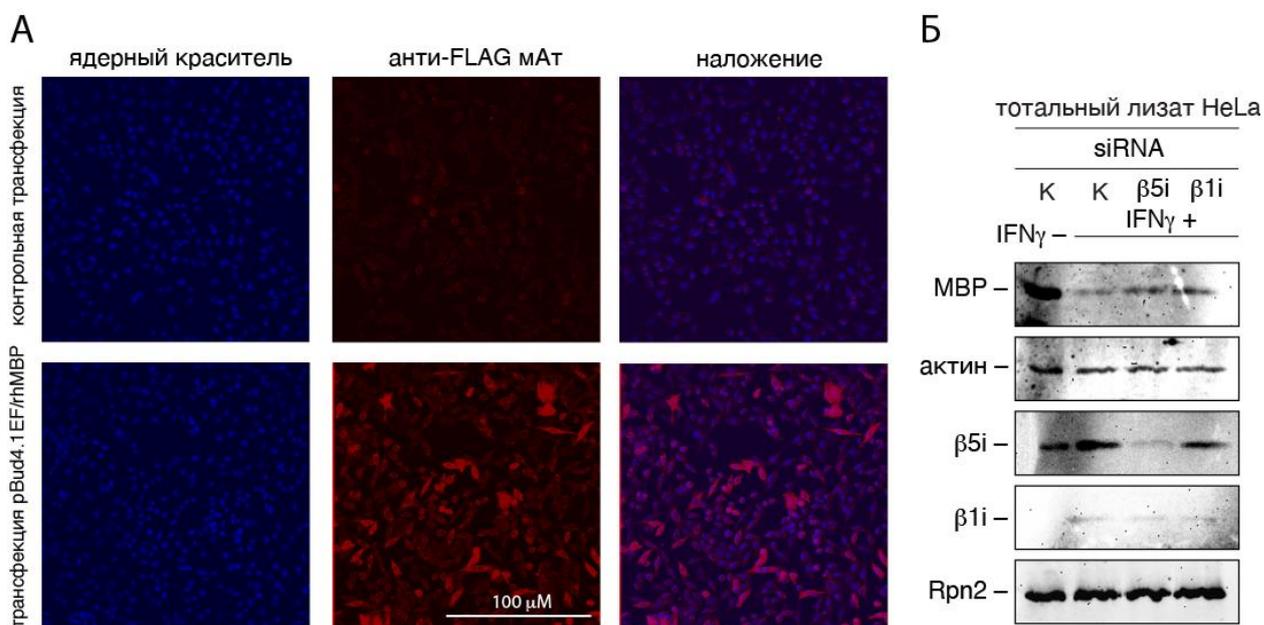


Рисунок 31. А. Иммуноцитохимический анализ клеток линии HeLa, трансфицированных генетической конструкцией, кодирующей MBP, слитный с Flag эпитопом. Контрольная трансфекция – HA-с-Мус. Б. Вестерн_блоттинг лизатов клеток линии HeLa, экспрессирующих рекомбинантный MBP, обработанных (IFN γ +) и необработанных (IFN γ -) интерфероном γ , а также клеток, в которых понижен уровень иммуносубъединиц $\beta 1i$ и $\beta 5i$ в результате воздействия малых интерферирующих РНК.

Использование ингибиторов протеасомы

Другой подход к блокированию протеолитической активности иммунопротеасомы заключается в применении низкомолекулярных ингибиторов. Для этого были проанализированы 3 ингибитора протеасомы: PS-341, воздействующий на все каталитические субъединицы конститутивной и иммунопротеасомы; MG-132, ингибирующий преимущественно химотрипсин-подобную активность конститутивной и иммунопротеасомы, и $\beta 1i$ -специфический пептидилэпоксикетон, необратимо ковалентно связывающий остаток треонина в активном центре данной субъединицы. Чтобы определить количественные параметры ингибирования, было проанализировано влияние

этих ингибиторов на активность протеасомы по флуорогенному субстрату Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (**Рис. 32**). Параметры ингибирования для PS-341 и MG-132 (**Табл. 3**) соответствовали ранее опубликованным данным [176, 177]. Константа ассоциации $k_{obs}/[I]$ для $\beta 5i$ -специфического пептидилэпоксикетона составила около $240 \text{ M}^{-1}\text{сек}^{-1}$. PS-341 и MG-132 одинаково воздействовали на протеасому из головного мозга здоровых и развивающих ЕАЕ мышей. В случае $\beta 1i$ -специфического пептидилэпоксикетона, как и следовало ожидать, эффективность ингибирования напрямую зависела от количества конститутивных и иммуносубъединиц протеасомы. Наиболее эффективно данный ингибитор подавлял активность протеасомы из головного мозга ЕАЕ-SJL мышей, при этом он практически не воздействовал на протеасому из головного мозга мышей линии BALB/c (**Рис. 33А**). Все три протестированных ингибитора существенно замедляли гидролиз MBP 26S протеасомой *in vitro* (**Рис. 33Б**).

Таблица 3. Ингибирование химотрипсин-подобной активности протеасомы из головного мозга мышей.

26S протеасома из головного мозга	PS-341* K_i , нМ	MG-132† K_i , нМ	$\beta 1i$ -PEK $k_{obs}/[I]$, $\text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$
BALB/c	7±2	28±8	не определена
Контрольные SJL	10±3	35±8	230±60
ЕАЕ SJL	6±2	26±4	250±40

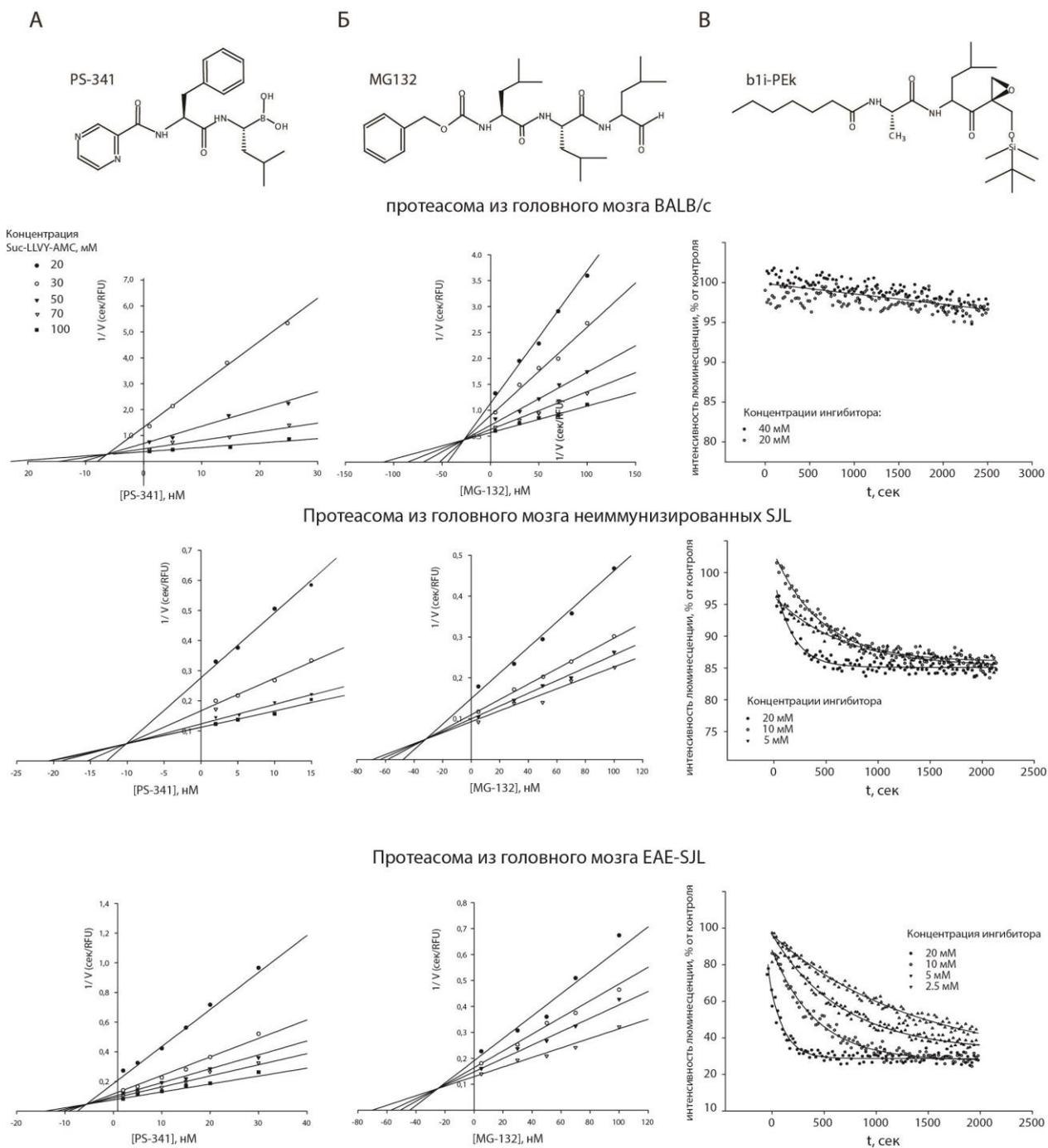


Рисунок 32. Определение констант ингибирования для PS-341 (А), MG-132 (Б) и β 1i-специфического пептидилэпоксикетона (В) на основании экспериментальных данных. В случае необратимо связывающегося ковалентного ингибитора β 1i-специфического пептидилэпоксикетона на рисунке представлена постепенно снижающаяся интенсивность люминесценции после добавления ингибитора, пропорциональная скорости гидролиза пептидного субстрата. Линии на рисунках В были получены аппроксимацией экспериментальных данных нелинейным методом наименьших квадратов к уравнению 2 (см. материалы и методы). Г. Воздействие ингибиторов протеасомы на гидролиз MBP *in vitro* 26S протеасомой из головного мозга мышей SJL-EAE.

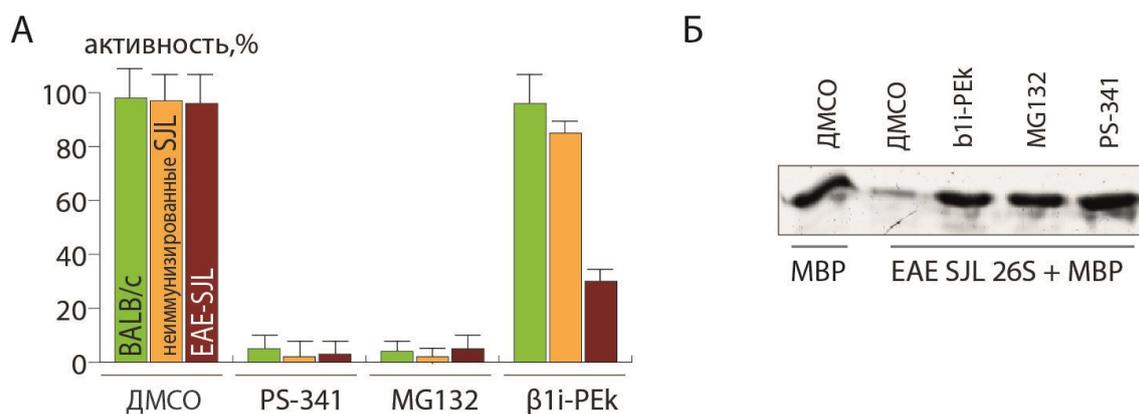


Рисунок 33. Химотрипсин-подобная активность протеасомы (в процентах от активности протеасомы, не обработанной ингибиторами) при воздействии 1% ДМСО (контроль), 1 мкМ PS-341, 1 мкМ MG-132 и 1 мкМ β 1i-специфического пептидилэпоксикетона

На конечном этапе была протестирована способность ингибиторов PS-341 и β 1i-специфического пептидилэпоксикетона подавлять развитие EAE у мышей линии SJL. Мышей с индуцированным EAE разделили на группы согласно таблице 4. Указанные препараты вводили внутривенно в хвостовую вену 2 раза в неделю с первого по 21й день после иммунизации. Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что β 1i-специфический пептидилэпоксикетон снижает тяжесть протекания заболевания эффективнее, чем PS-341 в той же дозировке (0.5 мг/кг) (Рис. 34).

Таблица 4. Терапия EAE ингибиторами протеасомы у мышей линии SJL.

Группа	Количество мышей	Ингибитор	Доза, мг/кг	Объем инъекции, мкл	Включая ДМСО, мкл	Введение*	Иммунизация
1	10	PS-341	0.5	250	10	+	+
2	10	β 1i-PEK	0.5	250	10	+	+
3	10	–	–	250	10	+	+
4	5	–	–	250	10	+	–
5	5	–	–	–	0	–	+
6	5	–	–	–	0	–	–

*2 раза в неделю с дня 0 до дня 21 после иммунизации

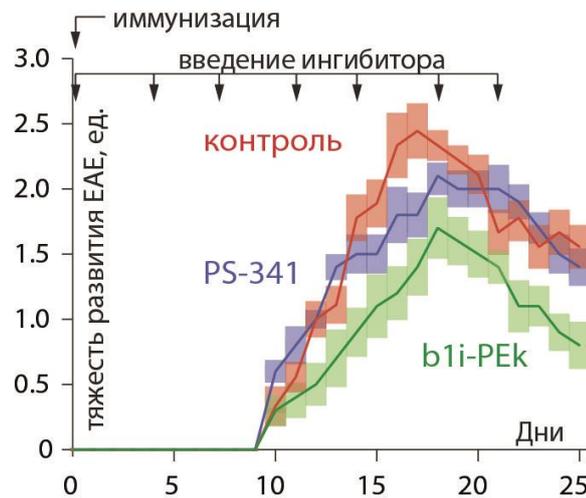


Рисунок 34. Развитие EAE у мышей линии SJL без терапии и при введении ингибиторов PS-341 и β 1i-специфического пептидилэпоксикетона в дозе 0,5 мг/кг 2 раза в неделю в течение 21 дня после иммунизации.

Как уже упоминалось ранее, ингибиторы протеасомы в настоящее время активно исследуются как потенциальные терапевтические средства против аутоиммунных заболеваний. В работе [139] показано, что ингибитор PR-957, специфический к β 5i каталитической субъединице иммунопротеасомы, снижает тяжесть течения заболевания и предотвращает возникновение обострений при EAE у мышей линии C57BL/6, иммунизированных MOG₃₅₋₅₅ или PLP₁₃₉₋₁₅₁. Терапевтический эффект в этом случае обусловлен воздействием на клетки иммунной системы, благодаря высокому содержанию в них именно иммуносубъединицы β 5i. Преимущественная локализация β 5i в инфильтрирующих лимфоцитах также была подтверждена и в настоящей работе. Исходя из его мишени, механизм действия PR-957 заключается в подавлении миграции активированных лимфоцитов, в особенности CD4⁺ Т-хелперов, и активированных миелоидных клеток в ЦНС экспериментальных животных; блокировании дифференциации CD4⁺ Т-клеток в Th1 и Th17, увеличении количества регуляторных Т-клеток (Treg), а также в снижении продукции ряда цитокинов. Очевидно, что подобное протективное действие сопровождается рядом системных осложнений, вследствие неспецифического угнетения функций иммунной системы в целом. Выполненные нами эксперименты наглядно демонстрируют, что при развитии EAE иммунопротеасома в олигодендроцитах содержит преимущественно субъединицу β 1i. На основании этого факта можно предположить, что терапевтическое действие β 1i-специфического ингибитора основано на ингибировании продукции антигенных пептидов в олигодендроцитах, что препятствует их узнаванию цитотоксическими Т-лимфоцитами, нежели на подавлении функций Т-лимфоцитов как таковых. Таким образом, применение

β 1i-специфического ингибитора потенциально может быть более предпочтительным с точки зрения безопасности клинического применения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Химические реактивы и сопутствующие материалы.

В работе использовали следующие реактивы и материалы:

Основные реактивы: трис-гидрокси метиламинометан (трис), персульфат аммония, тетраборат натрия, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), одно- и двузамещенный фосфат натрия, хлорид натрия, ацетат натрия, хлорид магния, глицин, β -меркаптоэтанол, диметилсульфоксид (ДМСО), дитиотреитол (DTT), аденозин-5'-трифосфат (АТФ), креатинфосфат (Sigma Aldrich, США); акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, додецилсульфат натрия (SDS), мочевины sequence grade, нитроцеллюлозную мембрану Hybond C extra (Amersham, США); nonidet P-40 (NP40) (Difco, Великобритания), ядерный краситель Hoechst 33342 (Life Technologies, США). Остальные реактивы отечественного производства марки "осч" (особо чистые).

Вода, содержащая атом кислорода с массовым числом 18, была произведена в Национальном исследовательском центре «Курчатовский институт».

Генетическая конструкция, кодирующая рекомбинантный основной белок миелина человека, была получена ранее в лаборатории биокатализа ИБХ РАН А.А.Кудряевой и Т.В.Бобик. Генетические конструкции, кодирующие убиквитин с HA и мус эпителиями, K0-убиквитин с HA и мус эпителиями, с-Мус с HA-эпитопом, были любезно предоставлены Dr. Kazuhiro Iwai (Высшая школа Медицины, Университет Осака, Осака, Япония). Генетические конструкции, кодирующие p105 с FLAG-эпитопом и Ubc6, была любезно предоставлена Dr. Aaron Ciechanover (Лаборатория метаболизма белка, Технион, Хайфа, Израиль). Генетическая конструкция, кодирующая рекомбинантную орнитиндекарбоксилазу с FLAG-эпитопом, была любезно предоставлена Dr. Chaim Kahana (Вайзманн институт, Реховот, Израиль).

Малые интерферирующие РНК к убиквитин-лигазе E1, а также некодирующая siRNA были произведены Dharmacon RNAi, GE Healthcare, Великобритания. Малые интерферирующие РНК к субъединицам протеасомы были синтезированы в сотрудничестве с профессором Е.Л.Черноловской (Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской Академии наук, Новосибирск).

Ферменты: креатинфосфокиназа из мышц кролика, трипсин из поджелудочной железы коровы, химотрипсин из поджелудочной железы коровы, рекомбинантная матриксная

металлопротеаза 3 (ММР-3), рекомбинантная матриксная металлопротеаза 9 (ММР-9), кальпаин из плазмы крови человека, коллагеназа D из *Clostridium histolyticum* (Roche Life Science, Германия), ДНКаза из поджелудочной железы коровы (Sigma Aldrich, США).

Другие белки: ингибитор трипсина из соевых бобов (GERBU Biotechnik GmbH, Германия), бычий сывороточный альбумин, актин из мышц свиньи, лизоцим из куриного яйца, кальмодулин из мозга коровы (Sigma Aldrich, США), рекомбинантный убиквитин, рекомбинантный K-48 тетраубиквитин, рекомбинантный метилированный убиквитин (Boston Biochem, США), копаксон (глатирамера ацетат) (Teva, Израиль), маркеры молекулярной массы белков Protein Molecular Weight Marker 14.4-116.0 кДа, Prestained Protein Molecular Weight Marker 19.0-118.0 кДа (Fermentas, Литва). Рекомбинантный гистон H1.3 любезно предоставлен П.Кругляковым (ЗАО «Фармсинтез»). Рекомбинантный тиоредоксин получен в лаборатории биокатализа Степановым А.В.

Ингибиторы и субстраты протеасомы: MG132 (карбоксибензоил-L-лейцил-L-лейцил-L-лейцинал) (Boston Biochem, США), ингибитор протеасомы PS-341 (PS-341) (LC laboratories, США), β 5i-специфический пептидилэпоксикетон был синтезирован в группе синтеза природных соединений ИБХ РАН под руководством И.В.Ямпольского по методике, описанной в [21], субстрат *N*-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Sigma Aldrich, США), наборы для определения трипсин-подобной, химотрипсин-подобной и каспазоподобной протеолитической активности протеасомы Proteasome-Glo kits (Promega, США)

Реактивы для получения клеточных культур и культивирования клеток: рекомбинантные интерлейкин-2 и интерлейкин-7 мыши, селенит натрия, апо-трансферрин, рекомбинантный цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), рекомбинантный инсулин, биотин, гидрокортизон, трийодтиронин (Т3), рекомбинантный интерферн-гамма мыши и человека (Sigma Aldrich, США). Ростовые среды DMEM, opti-MEM и advanced RPMI, фетальная бычья сыворотка (Gibco, США), раствор гентамицина (ПанЭко, Россия), раствор фикола Ficolл Paque Plus (GE Healthcare, Великобритания), набор для выделения CD8⁺ Т-клеток мыши Dynabeads® Untouched™ Mouse CD8 Cells Kit (Life Technologies, США).

Эукариотические клетки: клетки линий НЕК и HeLa, первичные культуры олигодендроцитов, мононуклеарных клеток периферической крови, CD8⁺ Т-лимфоцитов и дендритных клеток мыши (получение первичных культур описано в разделе «методы»)

Антитела и конъюгаты: антитела к с-тус эпитопу, продуцируемые гибридомой С-МҮС, антитело мыши к β -актину, антитело крысы к CD3 (Santa Cruz Biotechnology, США), антитела мыши к субъединицам протеасомы Rpt6, α , β 5, антитела кролика к субъединицам протеасомы β 1i, β 5i, β 1, Rpn13, антитела кролика к убиквитин-лигазе E1 и к полиубиквитиновым конъюгатам (Enzo life sciences, США), антитела мыши к маркеру олигодендроцитов O4, антитела козы к Fc-фрагменту IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена, антитела козы к IgM мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена, антитела козы к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена, антитела кролика к MBP, антитела мыши к FLAG-эпитопу, конъюгированные с пероксидазой хрена, (Sigma Aldrich, США), антитела осла к IgG кролика, IgG крысы, IgG мыши и IgM мыши, конъюгированные с флуоресцентными красителями (Alexa 405, Alexa 488, Alexa 594) (Life Technologies, США), антитела мыши к NeuN (Millipore, США), антитела крысы к MBP, антитела кролика к MBP, конъюгированные с пероксидазой хрена, антитела кролика к субъединице протеасомы Rpn10, антитела курицы к HA-тэгу, конъюгированные с пероксидазой хрена (Abcam, Великобритания).

Животные: мыши линии Balb/c, мыши линии SJL, мыши линии C3H, мыши линии C57BL/6 (Питомник ФИБХ г.Пущино, Россия); мыши линии SJL (Harlan, Израиль).

Растворы

Все растворы готовились на дистиллированной воде или на воде особой чистоты из установки "Milli-Q" (Millipore).

PBS: 8.0 г/л NaCl, 0.2 г/л KCl, 1.15 г/л Na₂HPO₄, 0.2 г/л KH₂PO₄, pH 7.2.

TBS: 20 mM Трис-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5

Конъюгатный буфер для вестерн-блоттинга: TBS, 0,5% BSA или обезжиренное сухое молоко, 0.05% Tween-20.

Двухкратный буфер нанесения образцов для электрофореза по Леммли: 5% 2-меркаптоэтанола, 4% SDS, 0.25 M Трис-HCl, pH 6.8; 4 mM ЭДТА, 10% глицерина, 0.25 мг/мл бромфенолового синего.

Пятикратный электродный буфер для электрофореза по Леммли: глицин 72 г/л, SDS 5 г/л, Трис-HCl 6.5 г/л, pH 8.3.

Буфер переноса для иммуноблоттинга: 39mM глицин, 48mM Трис-HCl, 0.0375% SDS, 20% этанола.

Буфер для нативного электрофореза: 0.09 М Tris (pH 8.3), 0.09М H₃BO₃, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ АТФ, 1 мМ DTT

KRB (Буфер Кребса-Рингера): 122мМ NaCl, 5мМ KCl, 1мМK₂HPO₄, 25мМ NaHCO₃, 14мМ глюкоза, 0,01мг/мл феноловый красный.

Буферные растворы для выделения протеасомы:

Буфер А: 20 мМ Трис-НСl, 100мМ NaCl, 1мМ ЭДТА, 5мМ MgCl₂, 1мМ DTT, 2мМ АТФ, 10% глицерина, pH 7.5.

Буфер Б: 20мМ Трис-НСl, 250мМ NaCl, 1мМ ЭДТА, 5мМ MgCl₂, 1мМ DTT, 1мМ АТФ, 20% глицерина, pH 7.5.

Буфер Г: 20 мМ Трис-НСl, 1мМ ЭДТА, 5мМ MgCl₂, 1мМ DTT, 1мМ АТФ, pH 7.5.

Буфер Е: 20 мМ Трис-НСl, 0.1мМ ЭДТА, 1мМ DTT, 0.1мМ АТФ, 10% глицерина, pH 7.8.

Буфер для хранения протеасомы: буфер Г + 10% глицерина.

Работа с белками

Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле.

Электрофорез проводили по стандартной методике Лэммли [178]. Готовили двухкомпонентный гель следующего состава: концентрирующий гель – 5% смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% SDS, 0.125 М Трис –НСl, pH 6.8; разделяющий гель – 12-15% смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% SDS, 0.375 М Трис–НСl, pH 8.9. Для полимеризации сначала добавляли N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин до концентрации 0,1%, а затем персульфат аммония до 0,1%. Образцы белковых препаратов смешивали с буфером нанесения в соотношении 1:1, прогревали 5 минут при 95°C, наносили на гель и вели электрофорез при напряжении 90 В до перемещения красителя в разделяющий гель, после чего выставляли силу тока 20 мА на 1 пластину геля и вели электрофорез до момента выхода краски из разделяющего геля. По окончании электрофореза отделяли разделяющий гель, который затем окрашивали Кумасси синим R-250.

Окрашивание ПААГ Кумасси синим R-250 с усилением контраста солью меди

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.

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 Bio-Rad Trans-blot Turbo (Bio-Rad, США) 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 в все буфере для переноса. 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/см². По окончании процесса мембрану помещали в блокирующий раствор, содержащий 5% BSA в TBS или обезжиренного сухого молока в воде, на качающуюся платформу. Инкубацию вели 1 час при комнатной температуре или 12-24 часа при +4°C. Далее мембрану отмывали 3 раза по 5 минут в TBS, содержащем 0.05% Tween 20. Гибридизацию с первичными антителами проводили в течение часа в конъюгатном буфере, после чего опять трижды отмывали. Затем мембрану час инкубировали со вторичными антивидовыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в том же буфере и отмывали 5 раз по 5 минут. Проявление мембраны проводили с помощью кита ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham, США). Денситометрический анализ результатов вестерн-блоттинга, а также электрофореза по Лэммли, проводили с помощью программы Quantity One.

Электрофорез в неденатурирующих условиях

Анализ состава препаратов протеасомы с помощью нативного электрофореза проводили по методике, описанной в [179]. Состав форезного буфера совпадал с составом буфера для гелей. Использовали 4% разделяющий гель и 2,5% концентрирующий гель, соотношение акриламид:бис-акриламид составляло 37,5:1, для полимеризации к раствору

добавляли 0,1% N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин и 0,1% персульфата аммония. В каждую лунку наносили 2-4 мкг протеасомы в буфере для хранения. Электрофорез вели при 100-150 В при температуре +4°C в течение 2 часов. После этого гели инкубировали в 10 мл 100 мкМ раствора Suc-LLVY-АМС в буфере Г и визуализировали на приборе Versa Doc imaging system (Bio-Rad, США). Нативный электрофорез основного белка миелина проводили при рН 4.5 в полиакриламидном геле на основе ацетатного буфера по методике, описанной в [180] с последующим окрашиванием гелей Кумасси R-250.

Иммунопреципитация

Образцы 26S протеасомы (50 мкг/мл) обрабатывали PS-341 (15 мкМ) в течение 10 минут, затем инкубировали с МВР (1 мг/мл) 30 минут при +4°C, затем в смесь добавляли антитело анти-Rpn10 (H00005710-B01P, Abnova, Тайвань) или анти-МВР (ab7349, Abcam, Великобритания), инкубировали еще 45 минут при +4°C. Затем добавляли смолу Protein A Sepharose (Pharmacia Biotech, Швеция), перемешивали на шейкере 45 минут при +4°C, промывали PBS и элюировали преципитированные белки буфером глицин-HCl: (0.1 М глицина, рН 3.0)

Работа с эукариотическими клетками.

Методы работы с эукариотическими клетками линии НЕК и HeLa

Поддержание в культуре эукариотических клеток линии НЕК и HeLa.

Клетки выращивали в среде DMEM, содержащей 10% бычьей фетальной сыворотки и 2мМ L-глутамина, в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ во флаконах (25 см²). При достижении монослоя клетки рассевали. Отбирали культуральную среду, клетки промывали 5 мл стерильного 1хPBS, потом добавляли 0.5 мл 0.25% раствора трипсина в изотоническом буфере и инкубировали 3-5 минут при 37°C до открепления клеток. Открепившиеся клетки смывали и ресуспендировали в 4,5 мл среды DMEM с 10% бычьей фетальной сыворотки. Затем клетки рассевали 1/5 по объему суспензии.

Трансфицирование эукариотических клеток методом липофекции.

Перед проведением трансфекции плазмидные ДНК дополнительно очищали 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 2-6·10⁴ клеток линии CHO в лунки 24-луночного планшета в 500 мкл среды DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), содержащей 10%

фетальной сыворотки. Растворяли 0.4мкг ДНК в 25 мкл среды opti-MEM без сыворотки и антибиотиков, добавляли 0.4 мкл Plus™Reagent, перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Добавляли 2 мкл Lipofectamine™Reagent в 25 мкл среды opti-MEM без сыворотки и антибиотиков, перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Смешивали полученные растворы и добавляли по 50 мкл к клеткам. Клетки выращивали в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Анализировали через 24-72 часа.

Для трансфицирования клеток малыми интерферирующими РНК (siRNA) использовали Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen, США) согласно рекомендации производителя. Растворяли 10 пмоль siRNA в 25 мкл среды opti-MEM без сыворотки и антибиотиков. Также в 25 мкл среды opti-MEM без сыворотки и антибиотиков добавляли 3мкл реагента Lipofectamine™ RNAiMAX, растворы смешивали друг с другом и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем полученные растворы добавляли к клеткам по 50мкл на 1 лунку 24-луночной плашки.

При необходимости трансфицирования клеток и плазмидной ДНК, и siRNA в одном эксперименте сначала трансфицировали клетки siRNA, затем через 24 часа меняли культуральную среду на свежую, проводили трансфекцию плазмидной ДНК, и через 24 часа после этого анализировали.

Получение культуры зрелых олигодендроцитов

Культуру зрелых олигодендроцитов получали из головного мозга мышат возрастом 2-3 дня по методике, описанной в [181]. Мелко порезанные ткани головного мозга обрабатывали последовательно трипсином и ДНКазой, отделяли отдельные клетки центрифугированием и высевали на культуральные флаконы, покрытые поли-L-лизинном и культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки и 10 мкг/мл гентамицина. Через 7 дней олигодендроциты отделяли от остальных клеток по принципу различной силы адгезии, качая культуральные флаконы на орбитальной качалке со скоростью 200 оборотов/мин и амплитудой 2.5 см сначала 1 час, затем 16-20 часов. Полученные олигодендроциты высевали на 48-луночные культуральные планшеты, покрытые поли-орнитином с молекулярной массой 30-70 кДа и культивировали 14-20 дней в среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки, 10 мкг/мл гентамицина, 0.1% BSA, 50 мкг/мл апотрансферрина, 5 мкг/мл инсулина, 30 нМ селенита натрия, 10 нМ биотина, 10 нМ гидрокортизона, 10 нг/мл цилиарного нейротрофического фактора (CNTF) и 15 нМ трийодтиронина (Т3).

Получение активированных CD8+ Т-клеток.

CD8+ Т-клетки получали по методике, описанной в [88]. Мононуклеарные клетки были выделяли из периферической крови мыши путем центрифугирования над раствором фиколла Ficoll Paque Plus (GE Healthcare, Великобритания). CD8+ клетки изолировали с помощью набора для негативной селекции Dynabeads Untouched Mouse CD8 Cells negative isolation kit (Life Technologies) в соответствии с инструкцией производителя ресуспендировали в культуральной среде advanced RPMI, содержащей 10% фетальной сыворотки, 10 мкг/мл гентамицина и 10 нг/мл рекомбинантного интерлейкина-7 мыши, и культивировали совместно с дендритными клетками в соотношении 4:1 (Т-лимфоциты к антигенпрезентирующим клеткам). Дендритные клетки получали, обрабатывая селезенки мыши коллагеназой D с последующим разделением клеток по принципу различной адгезии на пластике, по методике, описанной в [182]. Перед добавлением к CD8+ Т-клеткам дендритные клетки обрабатывали пептидами ENPVVHFF (MBP₈₃₋₉₀) или FNFTAPFI (эпитоп вируса энцефаломиелита Тейлера, контрольный иррелевантный пептид) (GeneCust, Luxembourg) в концентрации 10мкг/мл в течение 90 минут при 37°C. На третий день культивирования 50% культуральной среды заменяли на свежую и добавляли 50МЕ/мл рекомбинантного интерлейкина-2 мыши. На 7 день каждой последующей недели культивирования среду, содержащую суспензионные Т-лимфоциты отбирали, центрифугировали (350g, 8 минут), Т-лимфоциты ресуспендировали в свежей культуральной среде, содержащей интерлейкин-7, и добавляли к вновь выделенным свежим дендритным клеткам. Через 3 дня после этого среду частично заменяли на свежую с добавлением интерлейкина-2. Суммарное время культивирования составляло 4 недели.

Определение цитотоксической активности CD8+ Т-клеток.

Способность CD8+ Т-лимфоцитов лизировать таргетные клетки определяли с помощью набора DELPHIA cytotoxicity assay kit (Perkin-Elmer) в соответствии с инструкциями производителя. Олигодендрциты обрабатывали реагентом BATDA в течение 30 минут при 37°C, промывали PBS 5 раз и добавляли CD8+ Т-лимфоциты в соотношении 10:1 эффекторные:таргетные клетки. Через 2.5 часа культуральную среду отбирали и смешивали с раствором, содержащим соли европия Eu²⁺. Флуоресценцию измеряли методом TRF (time-resolved fluorescence) на приборе Varioskan Flash (Thermo, США) со следующими параметрами: длина волны возбуждения 340 нм, длина волны эмиссии 615 нм; задержка по времени 50 мкс, время интеграции 800 мкс, общее время измерения 5000 мс.

Иммуноцитохимическое окрашивание культур олигодендроцитов

Для иммуноцитохимического окрашивания олигодендроциты культивировали на круглых покровных стеклах диаметром 12 мм, покрытых поли-L-лизинном. Для окрашивания стекла с прикрепленными олигодендроцитами промывали PBS и фиксировали раствором 4% параформальдегида в PBS 20 минут при комнатной температуре. Пермеабелизовали 1 час при комнатной температуре в PBS содержащем 5% BSA и 0.2% Triton X-100. Блокировали 30 минут при комнатной температуре 50% лошадиной сывороткой в PBS. Окрашивание первичными антителами проводили в реакционном буфере на основе PBS, содержащем 1 мМ CaCl₂, 1% BSA, 0.1% Triton X-100 1 ч при комнатной температуре или 16-20 ч при +4°C. Вторичными антивидовыми антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями, окрашивали в том же буфере 30-60 минут при комнатной температуре, затем добавляли 1мкг/мл красителя Hoeschst 33342 на 3 мин. Промывали PBS 5раз и фиксировали на предметных стеклах с помощью реагента ProLong Gold Antifade Reagent (Life Technologies, США).

Индукция ЕАЕ у экспериментальных мышей

Эксперименты проводили в медицинском центре им. Асаф Арофе (Израиль) под руководством Д.Меламеда либо в питомнике лабораторных животных ФИБХ РАН под руководством Г.Б. Телегина с соблюдением всех регламентированных этических норм. ЕАЕ индуцировали в самках мышей линии SJL в возрасте от 6 до 8 недель с SPF (specified pathogen free) статусом в соответствии с протоколом [183] путем двукратного введения 100 мкг гомогената спинного мозга мыши (ГСММ) в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ), содержащем туберкулин в концентрации 4 мг/мл. Инъекции ГСММ на 1-й день производили подкожно в 2х точках, вдоль позвоночного столба, а на 3-й день в подошвы задних лап. Дополнительно в день инъекций ГСММ в ПАФ, мышам производили внутривенные инъекции раствора Pertussis toxin (Calbiochem, США) в количестве 500 нг/мышь. Тяжесть развития аутоиммунной патологии определяли ежедневно в соответствии со следующей шкалой: 0 - норма, 1 – потеря тонуса хвоста, 2 – слабость задних ног или их паралич, 3 – сильный паралич конечностей, 4 – полный паралич (неспособность двигаться), 5 – смерть.

Иммуногистохимия

Эксперименты проводили в сотрудничестве с Ю.В. Люпиной и Я.Д Карповой в лаборатории биохимии процессов онтогенеза под руководством Н.П. Шаровой в

Институте биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН. Животных перфузировали через сердце сначала 0,02 М PBS до вымывания крови из сосудов, а затем 4%-ным раствором параформальдегида на 0,02 М PBS в течение 15 минут при 4°. Далее у животных выделяли головной мозг и дофиксировали иммерсией (погружением в раствор) в том же фиксаторе 2-4 часа при комнатной температуре. Затем мозг помещали в 25%-ный раствор сахарозы для криопротекции на при +4°C. После этого замораживали в изопентане ($t = -45^{\circ}\text{C}$) и хранили при -20°C не более месяца. Криостатные срезы мозга толщиной 12 мкм монтировали на стекла, где и проводили двойное иммуногистохимическое окрашивание. 12 мкм криостатные срезы последовательно инкубировали: 1. в 0,5% тритоне X-100 с 5% BSA на PBS в течении 40 мин при 20°C; 2. в первичных антителах на PBS с 0,2% тритоном X-100 и 5% BSA в течение 18 часов при комнатной температуре

Отмывали три раза по 5 минут и обрабатывали вторичными антителами в PBS в течение 2-х часов при 20°C. Затем срезы тщательно отмывали, заключали в Mowiol и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM RXA2 (Германия), конфокального микроскопа Leica TCS SP (Германия). Специфичность первых антител подтверждалась с помощью контролей, при которых реакция проводилась в отсутствие первых антител. Возможность перекрестной реакции между первичными и вторичными антителами была исключена путем дополнительных контролей специфичности антител, при которых проводились инкубации каждого из первичных антител со вторичными антителами, выработанными к другому животному, то есть моноклональные антитела мыши инкубировали со вторичными антителами против иммуноглобулинов кролика, и наоборот. Отсутствие флуоресцентной метки свидетельствовало о специфичности реакции.

Получение очищенного препарата протеасомы

За основу была взята методика выделения протеасомы, описанная в [184]. Головной мозг мышей промывали буфером А, нарезали на небольшие куски, гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 3х объемах холодного (+4°C) буфера А и три раза проводили цикл замораживания-размораживания в жидком азоте. Центрифугировали от дэбриса при 1500g, +4°C, 30 минут, затем супернатант отделяли и центрифугировали при 13200g, +4°C, 30 минут. Полученный супернатант осаждали сульфатом аммония в концентрации 40% от насыщения в течение одного часа при +4°C для получения 26S протеасомы. Центрифугировали при 13200g, +4°C, 30 минут, осадок отделяли. При добавлении к полученному супернатанту сульфата аммония до концентрации 70% от насыщения в осадок выпадает фракция, содержащая 20S протеасому, которая в

дальнейшем может быть очищена по той же схеме, что и 26S. Осадок от высаливания 40% сульфатом аммония ресуспендировали в буфере Б, полученный раствор центрифугировали 13200g, +4°C, 10 минут для удаления нерастворившихся компонентов. Полученный таким образом раствор наносили на колонку Superose 6, уравновешенную буфером Б, и вели элюцию буфером Б на скорости 0.3 мл/мин. Собранные фракции анализировали на присутствие протеасомы, измеряя скорость гидролиза модельного пептидного субстрата Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA.

Фракции, содержащие протеасому, помещали в мешок для диализа и проводили диализ против буфера Е, содержащий 0.275 М NaCl. Полученный раствор наносили на колонку MonoQ, уравновешенную буфером Е, содержащий 0.275 М NaCl, и промывали 10 объемами этого буфера, затем проводили элюцию градиентом NaCl с 0.275 М до 1 М в 20-25 объемах буфера Е. Собранные фракции анализировали на присутствие протеасомы, измеряя скорость гидролиза модельного пептидного субстрата. Фракции, содержащие протеасому, переводили в буфер для хранения (буфер Г + 10% глицерина) методом диализа при +4°C. Если активность выделенной протеасомы по модельному субстрату была низкой, проводили концентрирование на микроколонках Microcon до концентрации 40мкг/мл (около 16 нМ). Концентрацию определяли по методу Брэдфорда.

Фракционирование протеасомы ультрацентрифугированием

Гомогенат головного мозга мыши в буфере А центрифугировали от дебриса при 1500g, +4°C 30 минут, затем супернатант отделяли и центрифугировали при 16000g, +4°C, 30 минут. К супернатанту добавляли MBP и 1мкМ PS-341 и наносили 0.8 мл полученной смеси на центрифужный стакан с градиентом глицерина 10-55% в 24 мл в буфере 25 мМ Tris-HCl pH 7.5, 1 мМ DTT, and 4 мМ ATP. Центрифугировали при 125000 g и +6°C 16 часов. Отбирали фракции по 1 мл каждая и определяли в них присутствие протеасомы по активности по флуорогенному субстрату Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC в присутствии 0,02% SDS (активация 20S протеасомы и ингибирование 26S протеасомы) и в отсутствии 0,02% SDS (активация 26S протеасомы и ингибирование 20S протеасомы)

Выделение, ацелирование и деиминирование MBP

MBP выделяли из головного мозга коровы по методике, описанной в [185], методом химической экстракции с последующей обращенно-фазовой хроматографией на препаративной колонке C₄ 10/250 (Mashery-Nagel, Германия) на HPLC-хроматографе Waters 1525 (Millipore, США) в градиенте ацетонитрила 0-80% в 15 объемах колонки. Во

всех растворах присутствовала 0.1% трифторуксусная кислота в качестве ион-парного агента. Чистоту полученного препарата МВР определяли электрофорезом по Лэммли.

Для некоторых экспериментов очищенный МВР ацетилировали уксусным ангидридом в различных молярных соотношениях по методике, описанной в [186]. МВР энзиматически деиминировали по методике, описанной в [102], инкубируя МВР с пептидиларгининдеиминазой (PAD) (Sigma Aldrich, США) при 52°C в буфере, содержащем HEPES, 5мМ CaCl₂, 2мМ DTT, pH 7.6. Реакцию останавливали кипячением в течение 5 минут. После ацетилирования или деиминирования МВР очищали на аналитической колонке C₄ 4.0/150 (Dr. Maisch GmbH, Германия) на HPLC-хроматографе Waters 1525 (Millipore, США) в градиенте ацетонитрила 0-40% в 15 объемах колонки. Во всех растворах присутствовала 0.1% трифторуксусная кислота в качестве ион-парного агента.

Убиквитинилирование *in vitro*

Для убиквитинилирования *in vitro* использовался набор Ubiquitin Conjugation kit (Enzo Life Sciences, США) на основе S100-экстракта из клеток линии HeLa, или цитоплазматический S100-экстракт, полученный из клеток линии HeLa или головного мозга мышей линии BALB/c по методике [187]. Реакционная смесь (12.5 мкл) содержала 20 мМ Tris (pH 7.5), 1 мМ DTT, 5мМ MgCl₂, S100-экстракт (60 мкг), убиквитин или метилированный убиквитин (5.0 мкг), АТФ (1.0 мМ), систему регенерации АТФ (фосфокреатин 10 мМ и креатинфосфокиназа 4 МЕ/мл), в некоторых случаях добавляли UbA1 (0.5 мкг), MG132 (200 мкМ), PS-341 (1.0 мкМ), очищенную 26S протеасому (0.25 мкг). Смесь инкубировали при 37°C и реакцию останавливали добавлением буфера нанесения для электрофореза по Лэммли.

Протеолиз белков *in vitro*

Гидролиз белков (1-3 мкг) протеасомой осуществляли в объеме реакции 12.5 мкл в реакционной смеси, содержащей 20 мМ Tris (pH 7.5), 1 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂, и очищенную 26S протеасому (0.25 мкг). Реакционную смесь инкубировали при 37°C, реакцию останавливали добавлением буфера для нанесения образцов для электрофореза по Лэммли. Образцы анализировали методом электрофореза по Лэммли с последующим окрашиванием красителем Кумасси R-250.

Гидролиз МВР протеолитическими ферментами производили, инкубируя их с 2 мкг МВР в молярном соотношении фермент:субстрат = 1:100 в объеме реакции 20 мкл 3 часа при 37°C в реакционном буфере 50 мМ Tris (pH 7.5), 5 мМ CaCl₂. Олигопептиды отделяли

от компонентов с высокой молекулярной массой на микроколонках Microcon YM-10000 (Merck Millipore, США) и направляли на масс-спектрометрию.

Определение кинетических параметров ингибирования протеасомы

Для изучения ингибирования протеасомы из головного мозга мыши использовались следующие концентрации ингибиторов: PS-341 0.1-1000 нМ, MG132 0.1-1000 нМ, β 1i-специфический пептидилэпоксикетон 2-100 мкМ. Кинетические параметры обратимого ингибирования измеряли с использованием пептидного субстрата Suc-LLVY-MCA, при гидролизе образующего флуоресцентный продукт – 7-амино-4-метилкумарин. Измерение интенсивности флуоресценции вели при длине волны поглощения 360 нм, длине волны флуоресценции 465 нм, температуре 37°C на приборе Tecan Genios (Tecan, Швейцария). Препарат протеасомы смешивали с растворами ингибитора и субстрата в буфере Г, инкубировали 20 мин при 37°C, после чего измеряли интенсивность флуоресценции каждые 30 секунд в течение 45 минут. По увеличению флуоресценции определяли скорость реакции гидролиза для всех комбинаций из 3 концентраций субстрата и 6 концентраций ингибитора. Результаты измерений обрабатывали в программе Sigma Plot 11.0 с модулем Enzyme Kinetics 1.3. Кинетические параметры необратимого ингибирования β 1i-специфическим пептидилэпоксикетоном определяли с использованием набора для определения химотрипсин-подобной активности протеасомы Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-Like bioluminescent assay system (Promega, США) на спектрофлуориметре Varioskan Flash (Thermo Scientific) в черной 384-луночной плашке при 37°C. Реагенты для измерения протеолитической активности протеасомы готовили в соответствии с инструкцией производителя, финальная концентрация пептидного субстрата Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-aminoluciferin составляла 20 мкМ, концентрация протеасомы 0.1 нМ. Измерение люминесценции начинали сразу же после добавления ингибитора. Значения $k_{obs}/[I]$ были получены с использованием программы SigmaPlot 11.0 аппроксимацией экспериментальных данных нелинейным методом наименьших квадратов к уравнению 1

$$(1) \quad L_t = L_s + (L_0 - L_s) \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t)$$

где L_0 - начальная интенсивность люминесценции, с течением времени приближающаяся к конечной интенсивности люминесценции L_s , с константой скорости k_{obs} . Для определения $k_{obs}/[I]$ реакцию проводили с 5 различными концентрациями ингибитора 3 раза с каждой концентрацией.

Методы масс-спектрометрического анализа

Тандемный хромато-масс-спектрометрический анализ

Эксперименты проводили в сотрудничестве с А.С.Кононихиным в Центре масс-спектрометрии РАН под руководством профессора Е.Н. Николаева. Тандемный хромато-масс-спектрометрический анализ (ESI-MS + жидкостная хроматография) осуществляли на приборе Agilent 1100 series (AgilentTechnologies, США) с хроматографической колонкой Reprosil-PurBasicC18, (Dr.MaischHPLC, Германия). После нанесения 2 мкл образца проводили элюцию линейным градиентом ацетонитрила в воде в присутствии 0.1% муравьиной кислоты, с 3% до 50% в течение 45 минут, и затем 90% в течение 15 минут. Элюент направлялся в масс-спектрометр 7-TeslaFinniganLTQ-FTUltra (ThermoElectron, Германия) с самодельным наноэлектроспрейным источником ионизации. Масс-спектрометрический анализ фракций пептидов осуществлялся при помощи программы Xcalibur (Thermo Electron, Бремен, Германия) в 2-х стадийном режиме автоматического измерения спектров (рис. 1). На первой стадии в масс-спектрометре измерялись точные массы пептидов в диапазоне m/z 300-1600 с разрешением $R=50000$ для m/z 400 (число ионов в ячейке 5×10^6). На второй стадии из масс-спектра выбирались три максимальных пика, для которых производилась столкновительно-индуцированная фрагментация (CID). Фрагментация CID и измерение спектров CID фрагментов происходили в линейной квадрупольной ионной ловушке (число ионов 3×10^4). В режиме автоматического 2-х стадийного анализа пептиды, для которых фрагментация уже была проведена, динамическое исключались из рассмотрения на 30 секунд.

Для количественного LC-MS/MS анализа с применением $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$, сразу после ионообменной хроматографии фракцию, содержащую 26S протеасому подвергали диализу против буфера Г на основе H_2^{18}O или H_2^{16}O . После диализа измеряли активность по субстрату Suc-LLVY-AMC и образцы протеасомы разводили до одинаковой активности на единицу объема. Лиофилизированный MBP разводили в 20 мМ Tris-HCl pH 7.5 на основе ^{18}O - или ^{16}O -воды. Смесь 26S протеасомы (20 мкг/мл) и MBP (100 мкг/мл), инкубировали при 37°C. Реакции останавливали, добавляя бортезомиб до концентрации 5 мкМ и сразу же замораживая. Непосредственно перед LC-MS/MS анализом, эквивалентные количества образцов на основе ^{18}O - и ^{16}O смешивали и анализировали по вышеописанной методике. Интенсивности пиков, соответствующих ^{18}O -меченым пептидам были скорректированы с учетом вклада немеченых ^{16}O -содержащих пептидов по уравнению 2

$$(2) \quad I[^{18}O] = \left(I_2 - \frac{M_2}{M_0} \cdot I_0 \right)$$

I_0 = измеренная относительная интенсивность моноизотопного пика; I_2 = измеренная относительная эффективность пика с массой + 2 Да; M_0 = теоретическая относительная интенсивность моноизотопного пика; M_2 = теоретическая относительная интенсивность моноизотопных пиков с массой +2Да. Для количественного анализа с использованием изотопно-меченного пептида ОБМ₈₃₋₉₀ [ENPVVHFF*] (F*=¹³C₉H₉¹⁵NO) (PeptideProteinResearch, Великобритания), меченый пептид смешивали с МВР, гидролизованным различными типами протеасомы, в одинаковых соотношениях (5мкл раствора пептида на 5 мкл образца). Каждый образец (10 мкл) содержал 2.5 нг ENPVVHFF*. 2 мкл этого образца наносили на колонку с помощью автоматического дозатора и подвергали LC-MS/MS анализу. Количество природного пептида определяли по соотношению меченого и немеченого пептида на масс-спектре. Относительные интенсивности пиков определяли по масс-хроматограмме при помощи программы Xcalibur (ThermoElectron, США).

Масс-спектрометрический анализ нативного белка (Top-down).

Эксперименты проводили в сотрудничестве с А.С.Кононихиным в Центре масс-спектрометрии РАН под руководством профессора Е.Н. Николаева. Для анализа модификаций нативного очищенного МВР использовали метод масс-спектрометрии высокого разрешения с электроспрейной ионизацией на приборе Bruker APEX Ultra FTICR (BrukerDaltonics, США), который оснащен сверхпроводящим соленоидом 7-Тесла и источником ионизации ApolloII. Для создания электроспрея использовались следующие условия: скорость потока 2 мкл/мин; положительная мода; напряжение на входном элетроде 3.5 kV; напряжение капилляра 4 кВ. Для внешней калибровки масс-спектрометра использовали стандартную смесь (Agilent, reorder № G2421A).

Масс-спектрометрия с мониторингом множественных реакций.

Эксперименты проводили в сотрудничестве с С.И.Ковальчуком в лаборатории протеомики ИБХ РАН, а также в лаборатории протеомного анализа НИИ физико-химической медицины под руководством профессора В.М. Говоруна. Анализ проводили на масс-спектрометре QTRAP4500, оснащенный источником ионов NanoSpray III (ABSciex, Канада) и совмещенном с нано-поточной хроматографической системой nanoLC400 (Eksigent, США). ВЭЖХ система использовалась в конфигурации предколонка

– разделяющая колонка. Для хроматографического разделения использовались следующие буферные растворы: буфер для загрузки образца на предколонку и буфер А - 98.9% H₂O, 1% метанол, 0.1% муравьиная кислота (v/v); буфер В - 99.9% ацетонитрил, 0.1% муравьиная кислота (v/v). Образцы наносили на предколонку Chrom XP C18 3 120 Å 350 μm*0.5 mm (Eksigent, США) при скорости потока 3 мкл/мин в течение 10 мин. Разделение осуществляли на колонке 3C18-CL-120 (3 мкм 120 Å) 75 мкм*150 мм (Eksigent, США) при скорости потока 300 нл/мин в линейном повышающемся градиенте буфера В от 5 до 50% за 20 мин. Колонку и предколонку регенерировали после каждого анализа промывкой 95% буфера В в течение 7 мин и уравнивали 5% буфера В в течение 25 мин. Между образцами для исключения вероятности неполной отмывки предыдущего образца через колонку и предколонку пропускали 5 коротких (5 мин) градиентов от 5 до 95% буфера В с 3 мин промывкой 95% буфером В в конце. Масс-спектрометр использовался в режиме анализа положительно-заряженных ионов. Фрагментация методом столкновительной диссоциации с использованием азота. Параметры MRM анализа для анализируемого пептида были оптимизированы в процессе прямого ввода раствора пептида в источник ионизации: родительский ион m/z 494.8 (z=+2), потенциал декластеризации 150В, время накопления сигнала для каждого фрагмента 100 мс, m/z фрагментных ионов (энергия столкновительной диссоциации, В): 745.5 (20), 648.4 (22), 549.3 (20), 450.2 (19), 433.2 (29), 580.3 (26). Анализ и обработку результатов проводили в программе SkyLine (MacCossLab).

Поверхностный плазмонный резонанс

Измерения поверхностного плазмонного резонанса проводили на приборе Biacore T200 optical biosensor (GE Healthcare) в Научно-образовательном центре нанотехнологий РАН Санкт-Петербургского академического университета с любезного разрешения первого проректора чл-корр. РАН М.В.Дубины. Все процедуры выполнялись при 25°C с использованием стандартных чипов для иммобилизации CM5 sensor chips и фирменного буфера HBS (pH 7.4, 0.01 М HEPES, 0.15 М NaCl, 0.05% сурфактанта P-20). Лиганды иммобилизовали на чипе (до достижения относительного сигнала иммобилизации ~3500 RU) с использованием NHS-EDC кита, следуя рекомендациям производителя. Аналиты добавляли в различных концентрациях. Поверхность чипов регенирировали между различными аналитами промывкой 10 mM Глициновым буфером, pH 2.5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые описан факт убиквитин-независимой протеасомной деградации белка, обладающего ярко выраженными свойствами аутоантигена. Патолофизиологическая значимость данного наблюдения состоит в том, что качественный и количественный состав антигенных пептидов, образующихся при протеолизе МВР, в основном определяется составом каталитических субъединиц протеасомы. На основании полученных в работе данных можно сделать предположение о роли убиквитин-независимого гидролиза МВР иммунопротеасомой в развитии аутоиммунных патологий ЦНС (**Рис. 35**). Рассеянный склероз и ЕАЕ характеризуются повреждением гематоэнцефалического барьера и развитием воспаления в ЦНС, что приводит к активному траффингу аутореактивных лимфоцитов в ЦНС. Секретируемые ими провоспалительные цитокины, в частности интерферон-гамма, взаимодействуют с соответствующими рецепторами на поверхности олигодендроцитов и посредством сигнальных каскадов активируют экспрессию в этих клетках иммуносубъединицы протеасомы $\beta 1i$. Поскольку иммунопротеасома отличается от конститутивной протеасомы по протеолитической активности и субстратной специфичности, спектр пептидов, образующихся при гидролизе неподконтрольного системе убиквитинилирования протеасомного субстрата МВР, различен в норме и при развитии аутоиммунной патологии ЦНС. В частности, под действием иммунопротеасомы образуется повышенное количество пептида МВР₈₃₋₉₀ [ENPVVHFF], который в контексте МНС I эффективно распознается CD8⁺ Т-лимфоцитами. Непосредственное взаимодействие олигодендроцитов с эффекторными клетками, обусловленное этими событиями, приводит к их гибели, которая может быть вызвана Fas-опосредованной индукцией апоптоза, а также физическим нарушением целостности мембраны олигодендроцитов под действием гранзимов и перфорина. Обратноположительная связь, усиливающая демиелинизацию, заключается в увеличении выброса интерферона-гамма при контакте цитотоксического лимфоцита и олигодендроцита, что приводит к еще большему количеству иммуногенных пептидов МВР, презентруемых на поверхности олигодендроцитов вследствие повышенного количества иммунопротеасомы. В результате происходит разрушение миелиновой оболочки и, как следствие, нарушение проведения нервного импульса, что приводит к уже системным сбоям работы ЦНС в целом.

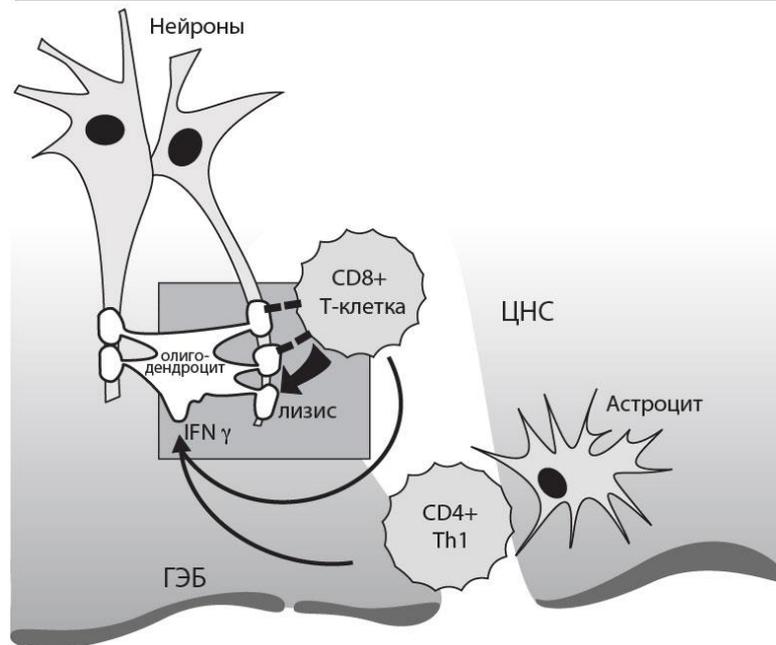
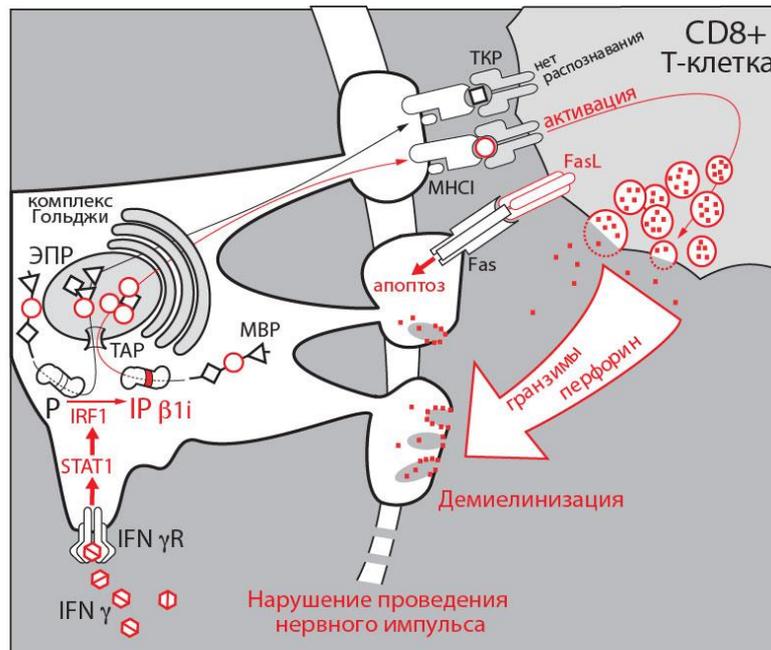


Рисунок 35. Предполагаемый молекулярный механизм патологической роли убиквитин-независимого гидролиза MBP иммунопротеасомой в развитии аутоиммунных патологий ЦНС

ВЫВОДЫ

1. На основе проведенных экспериментов показано, что один из наиболее важных аутоантигенов при рассеянном склерозе, основной белок миелина (МВР), при физиологически значимых концентрациях гидролизуется полноразмерной 26S протеасомой по убиквитин-независимому пути. Возможность убиквитин-независимого протеолиза МВР как минимум частично обусловлена его аномально высоким положительным зарядом.
2. Продемонстрировано, что количество каталитических иммуносубъединиц протеасомы значительно возрастает в ЦНС животных с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (ЕАЕ). При этом субъединица $\beta 1i$ локализована преимущественно в олигодендроцитах - резидентных клетках ЦНС, а $\beta 5i$ локализована преимущественно в Т-лимфоцитах, проникающих в ЦНС через поврежденный гематоэнцефалический барьер.
3. При гидролизе МВР иммунопротеасомой, выделенной из головного мозга мышей, развивающих ЕАЕ, образуется повышенное количество ряда пептидов, в том числе пептида МВР₈₃₋₉₀ [ENPVVHFF], являющегося частью энцефалитогенного фрагмента МВР. CD8⁺ Т-клетки, специфичные к данному пептиду, лизируют обработанные интерфероном-гамма олигодендроциты *ex vivo*, что указывает на возможную роль иммунопротеасомы в аутоиммунной демиелинизации.
4. Специфический ингибитор иммуносубъединицы $\beta 1i$ селективно воздействует на иммунопротеасому *in vitro*, а также эффективно подавляет развитие ЕАЕ *in vivo* у экспериментальных животных. Это свидетельствует о перспективности применения ингибиторов иммунопротеасомы, в том числе $\beta 1i$ -специфических пептидилэпоксикетонов, в качестве терапевтических средств против аутоиммунных заболеваний ЦНС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Structure of the human 26S proteasome: subunit radial displacements open the gate into the proteolytic core / P. C. da Fonseca and E. P. Morris // *J Biol Chem.* – 2008. – Vol. 283, no. 34. – P. 23305-23314.
2. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution / M. Groll, L. Ditzel, J. Lowe, et al. // *Nature.* – 1997. – Vol. 386, no. 6624. – P. 463-471.
3. Small-molecule inhibitors of proteasome activity / M. Gaczynska and P. A. Osmulski // *Methods Mol Biol.* – 2005. – Vol. 301, no. – P. 3-22.
4. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex / M. Orłowski and S. Wilk // *Arch Biochem Biophys.* – 2000. – Vol. 383, no. 1. – P. 1-16.
5. Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex / S. Wilk and M. Orłowski // *J Neurochem.* – 1983. – Vol. 40, no. 3. – P. 842-849.
6. Antigen processing by the proteasome / P. M. Klotzel // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2001. – Vol. 2, no. 3. – P. 179-187.
7. Global analysis of proteasomal substrate specificity using positional-scanning libraries of covalent inhibitors / T. Nazif and M. Bogyo // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001. – Vol. 98, no. 6. – P. 2967-2972.
8. Evidence that the nature of amino acid residues in the P3 position directs substrates to distinct catalytic sites of the pituitary multicatalytic proteinase complex (proteasome) / C. Cardozo, A. Vinitzky, C. Michaud, et al. // *Biochemistry.* – 1994. – Vol. 33, no. 21. – P. 6483-6489.
9. Substrate binding and sequence preference of the proteasome revealed by active-site-directed affinity probes / M. Bogyo, S. Shin, J. S. McMaster, et al. // *Chem Biol.* – 1998. – Vol. 5, no. 6. – P. 307-320.
10. Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown / A. F. Kisselev, T. N. Akopian, V. Castillo, et al. // *Mol Cell.* – 1999. – Vol. 4, no. 3. – P. 395-402.
11. A gated channel into the proteasome core particle / M. Groll, M. Bajorek, A. Kohler, et al. // *Nat Struct Biol.* – 2000. – Vol. 7, no. 11. – P. 1062-1067.
12. Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20 S proteasomes. Evidence for peptide-induced channel opening

in the alpha-rings / A. F. Kisselev, D. Kaganovich and A. L. Goldberg // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277, no. 25. – P. 22260-22270.

13. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity / B. C. Braun, M. Glickman, R. Kraft, et al. // *Nat Cell Biol.* – 1999. – Vol. 1, no. 4. – P. 221-226.

14. The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing / A. Sijts, Y. Sun, K. Janek, et al. // *Mol Immunol.* – 2002. – Vol. 39, no. 3-4. – P. 165-169.

15. Modeling the in vitro 20S proteasome activity: the effect of PA28- α and of the sequence and length of polypeptides on the degradation kinetics / M. Mishto, F. Luciani, H. G. Holzhutter, et al. // *J Mol Biol.* – 2008. – Vol. 377, no. 5. – P. 1607-1617.

16. Nucleotidase activities of the 26 S proteasome and its regulatory complex / L. Hoffman and M. Rechsteiner // *J Biol Chem.* – 1996. – Vol. 271, no. 51. – P. 32538-32545.

17. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle / G. C. Lander, E. Estrin, M. E. Matyskiela, et al. // *Nature.* – 2012. – Vol. 482, no. 7384. – P. 186-191.

18. Multiple chaperone-assisted formation of mammalian 20S proteasomes / S. Murata // *IUBMB Life.* – 2006. – Vol. 58, no. 5-6. – P. 344-348.

19. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing / B. Strehl, U. Seifert, E. Kruger, et al. // *Immunol Rev.* – 2005. – Vol. 207, no. – P. 19-30.

20. Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors / L. Burri, J. Hockendorff, U. Boehm, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – Vol. 97, no. 19. – P. 10348-10353.

21. LMP2-specific inhibitors: chemical genetic tools for proteasome biology / Y. K. Ho, P. Bargagna-Mohan, M. Wehenkel, et al. // *Chem Biol.* – 2007. – Vol. 14, no. 4. – P. 419-430.

22. Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity / E. M. Huber, M. Basler, R. Schwab, et al. // *Cell.* – 2012. – Vol. 148, no. 4. – P. 727-738.

23. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide / P. Cascio, C. Hilton, A. F. Kisselev, et al. // *Embo J.* – 2001. – Vol. 20, no. 10. – P. 2357-2366.

24. Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens / W. Chen, C. C. Norbury, Y. Cho, et al. // *J Exp Med.* – 2001. – Vol. 193, no. 11. – P. 1319-1326.

25. An altered T cell repertoire in MECL-1-deficient mice / M. Basler, J. Moebius, L. Elenich, et al. // *J Immunol.* – 2006. – Vol. 176, no. 11. – P. 6665-6672.
26. Critical role for the immunoproteasome subunit LMP7 in the resistance of mice to *Toxoplasma gondii* infection / L. Tu, C. Moriya, T. Imai, et al. // *Eur J Immunol.* – 2009. – Vol. 39, no. 12. – P. 3385-3394.
27. Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation / J. Chapiro, S. Claverol, F. Piette, et al. // *J Immunol.* – 2006. – Vol. 176, no. 2. – P. 1053-1061.
28. Why the structure but not the activity of the immunoproteasome subunit low molecular mass polypeptide 2 rescues antigen presentation / M. Basler, C. Lauer, J. Moebius, et al. // *J Immunol.* – 2012. – Vol. 189, no. 4. – P. 1868-1877.
29. Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes / S. Murata, K. Sasaki, T. Kishimoto, et al. // *Science.* – 2007. – Vol. 316, no. 5829. – P. 1349-1353.
30. Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides / S. Murata, Y. Takahama and K. Tanaka // *Curr Opin Immunol.* – 2008. – Vol. 20, no. 2. – P. 192-196.
31. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction / M. H. Glickman and A. Ciechanover // *Physiol Rev.* – 2002. – Vol. 82, no. 2. – P. 373-428.
32. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly / M. Koegl, T. Hoppe, S. Schlenker, et al. // *Cell.* – 1999. – Vol. 96, no. 5. – P. 635-644.
33. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor / K. Husnjak, S. Elsasser, N. Zhang, et al. // *Nature.* – 2008. – Vol. 453, no. 7194. – P. 481-488.
34. Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome / I. Jariel-Encontre, G. Bossis and M. Piechaczyk // *Biochim Biophys Acta.* – 2008. – Vol. 1786, no. 2. – P. 153-177.
35. Ubiquitin degradation with its substrate, or as a monomer in a ubiquitination-independent mode, provides clues to proteasome regulation / N. Shabek, Y. Herman-Bachinsky and A. Ciechanover // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – Vol. 106, no. 29. – P. 11907-11912.
36. The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation / A. M. Weissman, N. Shabek and A. Ciechanover // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2011. – Vol. 12, no. 9. – P. 605-620.
37. An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation / S. Prakash, L. Tian, K. S. Ratliff, et al. // *Nat Struct Mol Biol.* – 2004. – Vol. 11, no. 9. – P. 830-837.

38. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal / J. S. Thrower, L. Hoffman, M. Rechsteiner, et al. // *EMBO J.* – 2000. – Vol. 19, no. 1. – P. 94-102.
39. Regulation of Pax3 by proteasomal degradation of monoubiquitinated protein in skeletal muscle progenitors / S. C. Boutet, M. H. Disatnik, L. S. Chan, et al. // *Cell.* – 2007. – Vol. 130, no. 2. – P. 349-362.
40. Modification by single ubiquitin moieties rather than polyubiquitination is sufficient for proteasomal processing of the p105 NF-kappaB precursor / Y. Kravtsova-Ivantsiv, S. Cohen and A. Ciechanover // *Mol Cell.* – 2009. – Vol. 33, no. 4. – P. 496-504.
41. The size of the proteasomal substrate determines whether its degradation will be mediated by mono- or polyubiquitylation / N. Shabek, Y. Herman-Bachinsky, S. Buchsbaum, et al. // *Mol Cell.* – 2012. – Vol. 48, no. 1. – P. 87-97.
42. Proteasome substrate degradation requires association plus extended peptide / J. Takeuchi, H. Chen and P. Coffino // *EMBO J.* – 2007. – Vol. 26, no. 1. – P. 123-131.
43. Susceptibility of p53 unstructured N terminus to 20 S proteasomal degradation programs the stress response / P. Tsvetkov, N. Reuven, C. Prives, et al. // *J Biol Chem.* – 2009. – Vol. 284, no. 39. – P. 26234-26242.
44. The nanny model for IDPs / P. Tsvetkov, N. Reuven and Y. Shaul // *Nat Chem Biol.* – 2009. – Vol. 5, no. 11. – P. 778-781.
45. The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites / A. F. Kisselev, M. Garcia-Calvo, H. S. Overkleeft, et al. // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol. 278, no. 38. – P. 35869-35877.
46. Nature of pharmacophore influences active site specificity of proteasome inhibitors / M. Screen, M. Britton, S. L. Downey, et al. // *J Biol Chem.* – 2010. – Vol. 285, no. 51. – P. 40125-40134.
47. Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome / F. Parlati, S. J. Lee, M. Aujay, et al. // *Blood.* – 2009. – Vol. 114, no. 16. – P. 3439-3447.
48. Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin in cultured cells / L. R. Dick, A. A. Cruikshank, A. T. Destree, et al. // *J Biol Chem.* – 1997. – Vol. 272, no. 1. – P. 182-188.
49. How an inhibitor of the HIV-I protease modulates proteasome activity / G. Schmidtke, H. G. Holzhutter, M. Bogyo, et al. // *J Biol Chem.* – 1999. – Vol. 274, no. 50. – P. 35734-35740.

50. Molecular basis for proline- and arginine-rich peptide inhibition of proteasome / A. Anbanandam, D. C. Albarado, D. C. Tirziu, et al. // *J Mol Biol.* – 2008. – Vol. 384, no. 1. – P. 219-227.
51. Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors / D. J. Kuhn, S. A. Hunsucker, Q. Chen, et al. // *Blood.* – 2009. – Vol. 113, no. 19. – P. 4667-4676.
52. Lack of proteasome active site allostery as revealed by subunit-specific inhibitors / J. Myung, K. B. Kim, K. Lindsten, et al. // *Mol Cell.* – 2001. – Vol. 7, no. 2. – P. 411-420.
53. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis / T. Muchamuel, M. Basler, M. A. Aujay, et al. // *Nat Med.* – 2009. – Vol. 15, no. 7. – P. 781-787.
54. Inhibitors of the immunoproteasome: current status and future directions / Z. Miller, L. Ao, K. B. Kim, et al. // *Curr Pharm Des.* – 2013. – Vol. 19, no. 22. – P. 4140-4151.
55. Selective immunoproteasome inhibitors with non-peptide scaffolds identified from structure-based virtual screening / V. Kasam, N. R. Lee, K. B. Kim, et al. // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2014. – Vol. 24, no. 15. – P. 3614-3617.
56. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides / M. T. Heemels and H. Ploegh // *Annu Rev Biochem.* – 1995. – Vol. 64, no. – P. 463-491.
57. Survival of the fitters / H. G. Rammensee // *Nature.* – 2002. – Vol. 419, no. 6906. – P. 443-445.
58. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo / E. S. Trombetta and I. Mellman // *Annu Rev Immunol.* – 2005. – Vol. 23, no. – P. 975-1028.
59. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation / J. Neefjes, M. L. Jongsma, P. Paul, et al. // *Nat Rev Immunol.* – 2011. – Vol. 11, no. 12. – P. 823-836.
60. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum / T. Serwold, F. Gonzalez, J. Kim, et al. // *Nature.* – 2002. – Vol. 419, no. 6906. – P. 480-483.
61. Beyond the proteasome: trimming, degradation and generation of MHC class I ligands by auxiliary proteases / L. Saveanu, D. Fruci and P. van Endert // *Mol Immunol.* – 2002. – Vol. 39, no. 3-4. – P. 203-215.
62. A recyclable assay to analyze the NH(2)-terminal trimming of antigenic peptide precursors / L. Burri, C. Servis, L. Chapatte, et al. // *Protein Expr Purif.* – 2002. – Vol. 26, no. 1. – P. 19-27.

63. An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope / U. Seifert, C. Maranon, A. Shmueli, et al. // *Nat Immunol.* – 2003. – Vol. 4, no. 4. – P. 375-379.
64. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides / T. Saric, S. C. Chang, A. Hattori, et al. // *Nat Immunol.* – 2002. – Vol. 3, no. 12. – P. 1169-1176.
65. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent / M. K. Tewari, G. Sinnathamby, D. Rajagopal, et al. // *Nat Immunol.* – 2005. – Vol. 6, no. 3. – P. 287-294.
66. Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain / G. Lizee, G. Basha, J. Tiong, et al. // *Nat Immunol.* – 2003. – Vol. 4, no. 11. – P. 1065-1073.
67. И. А. З. Е.И.Гусев, А.Н.Бойко (2004). Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. Москва, Миклош.
68. Immunology of multiple sclerosis / M. Sospedra and R. Martin // *Annu Rev Immunol.* – 2005. – Vol. 23, no. – P. 683-747.
69. Multiple sclerosis etiology: beyond genes and environment / R. Mechelli, V. Annibaldi, G. Ristori, et al. // *Expert Rev Clin Immunol.* – 2010. – Vol. 6, no. 3. – P. 481-490.
70. Blood-brain barrier changes and cell invasion differ between therapeutic immune clearance of neurotrophic virus and CNS autoimmunity / M. J. Fabis, T. W. Phares, R. B. Kean, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – Vol. 105, no. 40. – P. 15511-15516.
71. Regulation of lymphocyte traffic by adhesion molecules / M. Fabbri, E. Bianchi, L. Fumagalli, et al. // *Inflamm Res.* – 1999. – Vol. 48, no. 5. – P. 239-246.
72. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients / T. L. Sorensen, M. Tani, J. Jensen, et al. // *J Clin Invest.* – 1999. – Vol. 103, no. 6. – P. 807-815.
73. Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions / A. Maeda and R. A. Sobel // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 1996. – Vol. 55, no. 3. – P. 300-309.
74. In vivo imaging of partially reversible th17 cell-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis / V. Siffrin, H. Radbruch, R. Glumm, et al. // *Immunity.* – 2010. – Vol. 33, no. 3. – P. 424-436.

75. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis / I. Nikic, D. Merkler, C. Sorbara, et al. // *Nat Med.* – 2011. – Vol. 17, no. 4. – P. 495-499.
76. EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis / B. A. t Hart, B. Gran and R. Weissert // *Trends Mol Med.* – 2011. – Vol. 17, no. 3. – P. 119-125.
77. Endogenous presentation of self myelin epitopes by CNS-resident APCs in Theiler's virus-infected mice / Y. Katz-Levy, K. L. Neville, A. M. Girvin, et al. // *J Clin Invest.* – 1999. – Vol. 104, no. 5. – P. 599-610.
78. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis / K. Ota, M. Matsui, E. L. Milford, et al. // *Nature.* – 1990. – Vol. 346, no. 6280. – P. 183-187.
79. Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis / R. Martin and H. F. McFarland // *Crit Rev Clin Lab Sci.* – 1995. – Vol. 32, no. 2. – P. 121-182.
80. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction / H. Babbe, A. Roers, A. Waisman, et al. // *J Exp Med.* – 2000. – Vol. 192, no. 3. – P. 393-404.
81. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes / C. B. Pettinelli and D. E. McFarlin // *J Immunol.* – 1981. – Vol. 127, no. 4. – P. 1420-1423.
82. W. Paul (2003). Fundamental immunology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins
83. Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis / J. R. Oksenberg, M. A. Panzara, A. B. Begovich, et al. // *Nature.* – 1993. – Vol. 362, no. 6415. – P. 68-70.
84. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay / M. P. Crawford, S. X. Yan, S. B. Ortega, et al. // *Blood.* – 2004. – Vol. 103, no. 11. – P. 4222-4231.
85. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis / J. Booss, M. M. Esiri, W. W. Tourtellotte, et al. // *J Neurol Sci.* – 1983. – Vol. 62, no. 1-3. – P. 219-232.
86. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions / R. Hoftberger, F. Aboul-Enein, W. Brueck, et al. // *Brain Pathol.* – 2004. – Vol. 14, no. 1. – P. 43-50.

87. Collateral bystander damage by myelin-directed CD8+ T cells causes axonal loss / B. Sobottka, M. D. Harrer, U. Ziegler, et al. // *Am J Pathol.* – 2009. – Vol. 175, no. 3. – P. 1160-1166.
88. MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes / A. Jurewicz, W. E. Biddison and J. P. Antel // *J Immunol.* – 1998. – Vol. 160, no. 6. – P. 3056-3059.
89. Experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by CD8+ T cells / Q. Ji and J. Goverman // *Ann N Y Acad Sci.* – 2007. – Vol. 1103, no. – P. 157-166.
90. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis / A. L. Zozulya and H. Wiendl // *Nat Clin Pract Neurol.* – 2008. – Vol. 4, no. 7. – P. 384-398.
91. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice / S. Hori, M. Haurly, A. Coutinho, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – Vol. 99, no. 12. – P. 8213-8218.
92. Multiple sclerosis / J. H. Noseworthy, C. Lucchinetti, M. Rodriguez, et al. // *N Engl J Med.* – 2000. – Vol. 343, no. 13. – P. 938-952.
93. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study / M. Reindl, C. Linington, U. Brehm, et al. // *Brain.* – 1999. – Vol. 122 (Pt 11), no. – P. 2047-2056.
94. Autoantibodies to myelin basic protein catalyze site-specific degradation of their antigen / N. A. Ponomarenko, O. M. Durova, Vorobiev, II, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 103, no. 2. – P. 281-286.
95. Interaction forces and adhesion of supported myelin lipid bilayers modulated by myelin basic protein / Y. Min, K. Kristiansen, J. M. Boggs, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – Vol. 106, no. 9. – P. 3154-3159.
96. Основной белок миелина. Структура, свойства, функции, роль в диагностике демиелинизирующих заболеваний. / В. П. Чехонин, О. И. Гурина, Т. Б. Дмитриева, et al. // *Вопросы медицинской химии.* – 2000. – Vol. 6, no. – P. 10-27.
97. Основной белок миелина. Структура, свойства, функции, роль в диагностике демиелинизирующих заболеваний. / В. П. Чехонин, О. И. Гурина, Т. Б. Дмитриева, et al. // *Вопросы медицинской химии.* – 2000. – Vol. 6, no. – P. 10-27.
98. Myelin in multiple sclerosis is developmentally immature / M. A. Moscarello, D. D. Wood, C. Ackerley, et al. // *J Clin Invest.* – 1994. – Vol. 94, no. 1. – P. 146-154.

99. Acute multiple sclerosis (Marburg type) is associated with developmentally immature myelin basic protein / D. D. Wood, J. M. Bilbao, P. O'Connors, et al. // *Ann Neurol.* – 1996. – Vol. 40, no. 1. – P. 18-24.
100. Deimination of membrane-bound myelin basic protein in multiple sclerosis exposes an immunodominant epitope / A. A. Musse, J. M. Boggs and G. Harauz // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 103, no. 12. – P. 4422-4427.
101. Structural insight into the role of myelin basic protein in multiple sclerosis / C. Husted // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 103, no. 12. – P. 4339-4340.
102. Deimination of myelin basic protein. 1. Effect of deimination of arginyl residues of myelin basic protein on its structure and susceptibility to digestion by cathepsin D / L. B. Pritzker, S. Joshi, J. J. Gowan, et al. // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39, no. 18. – P. 5374-5381.
103. Differences in susceptibility of MBP charge isomers to digestion by stromelysin-1 (MMP-3) and release of an immunodominant epitope / C. A. D'Souza and M. A. Moscarello // *Neurochem Res.* – 2006. – Vol. 31, no. 8. – P. 1045-1054.
104. Myelin basic protein, an autoantigen in multiple sclerosis, is selectively processed by human trypsin 4 / P. Medveczky, J. Antal, A. Patthy, et al. // *FEBS Lett.* – 2006. – Vol. 580, no. 2. – P. 545-552.
105. Increased calpain expression in activated glial and inflammatory cells in experimental allergic encephalomyelitis / D. C. Shields, W. R. Tyor, G. E. Deibler, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – Vol. 95, no. 10. – P. 5768-5772.
106. Matrix metalloproteinase proteolysis of the myelin basic protein isoforms is a source of immunogenic peptides in autoimmune multiple sclerosis / S. A. Shiryaev, A. Y. Savinov, P. Cieplak, et al. // *PLoS One.* – 2009. – Vol. 4, no. 3. – P. e4952.
107. Autocatalytic cleavage of myelin basic protein: an alternative to molecular mimicry / C. A. D'Souza, D. D. Wood, Y. M. She, et al. // *Biochemistry.* – 2005. – Vol. 44, no. 38. – P. 12905-12913.
108. Site-specific degradation of myelin basic protein by the proteasome / A. A. Belogurov, Jr., N. A. Ponomarenko, V. M. Govorun, et al. // *Dokl Biochem Biophys.* – 2009. – Vol. 425, no. – P. 68-72.
109. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress / U. Seifert, L. P. Bialy, F. Ebstein, et al. // *Cell.* – 2010. – Vol. 142, no. 4. – P. 613-624.
110. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? / M. Groettrup, C. J. Kirk and M. Basler // *Nat Rev Immunol.* – 2010. – Vol. 10, no. 1. – P. 73-78.

111. Unexpected role for the immunoproteasome subunit LMP2 in antiviral humoral and innate immune responses / S. E. Hensley, D. Zanker, B. P. Dolan, et al. // *J Immunol.* – 2010. – Vol. 184, no. 8. – P. 4115-4122.
112. Immunoproteasome LMP2 60HH variant alters MBP epitope generation and reduces the risk to develop multiple sclerosis in Italian female population / M. Mishto, E. Bellavista, C. Ligorio, et al. // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5, no. 2. – P. e9287.
113. Changes in 20S subunit composition are largely responsible for altered proteasomal activities in experimental autoimmune encephalomyelitis / J. Zheng, A. Dasgupta and O. A. Bizzozero // *J Neurochem.* – 2012. – Vol. 121, no. 3. – P. 486-494.
114. Dual inhibition of proteasomal and lysosomal proteolysis ameliorates autoimmune central nervous system inflammation / N. Fissolo, M. Kraus, M. Reich, et al. // *Eur J Immunol.* – 2008. – Vol. 38, no. 9. – P. 2401-2411.
115. Cross-reactions and specificities of monoclonal antibodies against myelin basic protein and against the synthetic copolymer 1 / D. Teitelbaum, R. Aharoni, M. Sela, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1991. – Vol. 88, no. 21. – P. 9528-9532.
116. Molecular mechanisms of the anti-inflammatory functions of interferons / P. Kovarik, I. Sauer and B. Schaljo // *Immunobiology.* – 2007. – Vol. 212, no. 9-10. – P. 895-901.
117. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial / H. P. Hartung, R. Gonsette, N. Konig, et al. // *Lancet.* – 2002. – Vol. 360, no. 9350. – P. 2018-2025.
118. Natalizumab for multiple sclerosis / R. M. Ransohoff // *N Engl J Med.* – 2007. – Vol. 356, no. 25. – P. 2622-2629.
119. Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients / A. H. Cross, J. L. Stark, J. Lauber, et al. // *J Neuroimmunol.* – 2006. – Vol. 180, no. 1-2. – P. 63-70.
120. B-cells in multiple sclerosis / M. Duddy and A. Bar-Or // *Int MS J.* – 2006. – Vol. 13, no. 3. – P. 84-90.
121. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis / S. L. Hauser, E. Waubant, D. L. Arnold, et al. // *N Engl J Med.* – 2008. – Vol. 358, no. 7. – P. 676-688.
122. The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy / J. Uchida, Y. Hamaguchi, J. A. Oliver, et al. // *J Exp Med.* – 2004. – Vol. 199, no. 12. – P. 1659-1669.

123. Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a 72-week, open-label, phase I trial / A. Bar-Or, P. A. Calabresi, D. Arnold, et al. // *Ann Neurol.* – 2008. – Vol. 63, no. 3. – P. 395-400.
124. Rituximab-induced B cell depletion in autoimmune diseases: potential effects on T cells / S. N. Liossis and P. P. Sfikakis // *Clin Immunol.* – 2008. – Vol. 127, no. 3. – P. 280-285.
125. Advances in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis / R. Tanasescu, C. Ionete, I. J. Chou, et al. // *Biomed J.* – 2014. – Vol. 37, no. 2. – P. 41-49.
126. Multiple sclerosis therapies: molecular mechanisms and future / P. Fontoura and H. Garren // *Results Probl Cell Differ.* – 2010. – Vol. 51, no. – P. 259-285.
127. Selective stimulation of T helper 2 cytokine responses by the anti-psoriasis agent monomethylfumarate / R. de Jong, A. C. Bezemer, T. P. Zomerdijk, et al. // *Eur J Immunol.* – 1996. – Vol. 26, no. 9. – P. 2067-2074.
128. The antipsoriatic agent dimethylfumarate immunomodulates T-cell cytokine secretion and inhibits cytokines of the psoriatic cytokine network / H. M. Ockenfels, T. Schultewolter, G. Ockenfels, et al. // *Br J Dermatol.* – 1998. – Vol. 139, no. 3. – P. 390-395.
129. Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human endothelial cells / M. Vandermeeren, S. Janssens, M. Borgers, et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1997. – Vol. 234, no. 1. – P. 19-23.
130. Multiple sclerosis: current and emerging disease-modifying therapies and treatment strategies / D. M. Wingerchuk and J. L. Carter // *Mayo Clin Proc.* – 2014. – Vol. 89, no. 2. – P. 225-240.
131. Immunotoxins for targeted cancer therapy / R. J. Kreitman // *AAPS J.* – 2006. – Vol. 8, no. 3. – P. E532-551.
132. Increased sophistication of immunotoxins / A. E. Frankel // *Clin Cancer Res.* – 2002. – Vol. 8, no. 4. – P. 942-944.
133. Amelioration of proteolipid protein 139-151-induced encephalomyelitis in SJL mice by modified amino acid copolymers and their mechanisms / J. N. Stern, Z. Illes, J. Reddy, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2004. – Vol. 101, no. 32. – P. 11743-11748.
134. Mannosylated PLP(139-151) induces peptide-specific tolerance to experimental autoimmune encephalomyelitis / M. E. Luca, J. M. Kel, W. van Rijs, et al. // *J Neuroimmunol.* – 2005. – Vol. 160, no. 1-2. – P. 178-187.
135. Design and synthesis of a cyclic double mutant peptide (cyclo(87-99)[A91,A96]MBP87-99) induces altered responses in mice after conjugation to mannan: implications in the

immunotherapy of multiple sclerosis / M. Katsara, G. Deraos, T. Tselios, et al. // *J Med Chem.* – 2009. – Vol. 52, no. 1. – P. 214-218.

136. Intravenous synthetic peptide MBP8298 delayed disease progression in an HLA Class II-defined cohort of patients with progressive multiple sclerosis: results of a 24-month double-blind placebo-controlled clinical trial and 5 years of follow-up treatment / K. G. Warren, I. Catz, L. Z. Ferenczi, et al. // *Eur J Neurol.* – 2006. – Vol. 13, no. 8. – P. 887-895.

137. A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis / V. A. Deshmukh, V. Tardif, C. A. Lyssiotis, et al. // *Nature.* – 2013. – Vol. 502, no. 7471. – P. 327-332.

138. Adeno-associated viral-mediated catalase expression suppresses optic neuritis in experimental allergic encephalomyelitis / J. Guy, X. Qi and W. W. Hauswirth // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – Vol. 95, no. 23. – P. 13847-13852.

139. Inhibition of the immunoproteasome ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis / M. Basler, S. Mundt, T. Muchamuel, et al. // *EMBO Mol Med.* – 2014. – Vol. 6, no. 2. – P. 226-238.

140. Treatment of established relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with the proteasome inhibitor PS-519 / C. L. Vanderlugt, S. M. Rahbe, P. J. Elliott, et al. // *J Autoimmun.* – 2000. – Vol. 14, no. 3. – P. 205-211.

141. Protection against experimental autoimmune encephalomyelitis by a proteasome modulator / H. Hosseini, P. Andre, N. Lefevre, et al. // *J Neuroimmunol.* – 2001. – Vol. 118, no. 2. – P. 233-244.

142. Two minor determinants of myelin basic protein induce experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice / D. H. Kono, J. L. Urban, S. J. Horvath, et al. // *J Exp Med.* – 1988. – Vol. 168, no. 1. – P. 213-227.

143. The encephalomyelitic activity of myelin isolated by ultracentrifugation / R. H. Laatsch, M. W. Kies, S. Gordon, et al. // *J Exp Med.* – 1962. – Vol. 115, no. – P. 777-788.

144. Recognition and degradation of myelin basic protein peptides by serum autoantibodies: novel biomarker for multiple sclerosis / A. A. Belogurov, Jr., I. N. Kurkova, A. Friboulet, et al. // *J Immunol.* – 2008. – Vol. 180, no. 2. – P. 1258-1267.

145. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis by a soluble peptide variant of a myelin basic protein epitope: T cell receptor antagonism and reduction of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha production / N. Karin, D. J. Mitchell, S. Brocke, et al. // *J Exp Med.* – 1994. – Vol. 180, no. 6. – P. 2227-2237.

146. Liposome-encapsulated peptides protect against experimental allergic encephalitis / A. A. Belogurov, Jr., A. V. Stepanov, I. V. Smirnov, et al. // *FASEB J.* – 2013. – Vol. 27, no. 1. – P. 222-231.

147. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg / A. Ciechanover and P. Brundin // *Neuron*. – 2003. – Vol. 40, no. 2. – P. 427-446.
148. Endoproteolytic activity of the proteasome / C. W. Liu, M. J. Corboy, G. N. DeMartino, et al. // *Science*. – 2003. – Vol. 299, no. 5605. – P. 408-411.
149. Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway / S. Gross-Mesilaty, E. Reinstein, B. Bercovich, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1998. – Vol. 95, no. 14. – P. 8058-8063.
150. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination / Y. Murakami, S. Matsufuji, T. Kameji, et al. // *Nature*. – 1992. – Vol. 360, no. 6404. – P. 597-599.
151. Ubiquitin-aldehyde: a general inhibitor of ubiquitin-recycling processes / A. Hershko and I. A. Rose // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1987. – Vol. 84, no. 7. – P. 1829-1833.
152. Developmental regulation of myelin basic protein in dispersed cultures / E. Barbarese and S. E. Pfeiffer // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1981. – Vol. 78, no. 3. – P. 1953-1957.
153. Migrating oligodendrocyte progenitor cells swell prior to soma dislocation / P. Happel, K. Moller, N. K. Schwering, et al. // *Sci Rep*. – 2013. – Vol. 3, no. – P. 1806.
154. Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis / G. Harauz, N. Ishiyama, C. M. Hill, et al. // *Micron*. – 2004. – Vol. 35, no. 7. – P. 503-542.
155. Charge effects modulate actin assembly by classic myelin basic protein isoforms / C. M. Hill and G. Harauz // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2005. – Vol. 329, no. 1. – P. 362-369.
156. Interaction of the 18.5-kD isoform of myelin basic protein with Ca²⁺-calmodulin: effects of deimination assessed by intrinsic Trp fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering, and circular dichroism / D. S. Libich, C. M. Hill, I. R. Bates, et al. // *Protein Sci*. – 2003. – Vol. 12, no. 7. – P. 1507-1521.
157. Proline substitutions and threonine pseudophosphorylation of the SH3 ligand of 18.5-kDa myelin basic protein decrease its affinity for the Fyn-SH3 domain and alter process development and protein localization in oligodendrocytes / G. S. Smith, M. De Avila, P. M. Paez, et al. // *J Neurosci Res*. – 2012. – Vol. 90, no. 1. – P. 28-47.
158. More than just tails: intrinsic disorder in histone proteins / Z. Peng, M. J. Mizianty, B. Xue, et al. // *Mol Biosyst*. – 2012. – Vol. 8, no. 7. – P. 1886-1901.
159. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates / Q. Deveraux, V. Ustrell, C. Pickart, et al. // *J Biol Chem*. – 1994. – Vol. 269, no. 10. – P. 7059-7061.

160. Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction / P. Schreiner, X. Chen, K. Husnjak, et al. // *Nature*. – 2008. – Vol. 453, no. 7194. – P. 548-552.
161. Interaction of myelin basic protein with cytoskeletal and signaling proteins in cultured primary oligodendrocytes and N19 oligodendroglial cells / J. M. Boggs, L. Homchaudhuri, G. Ranagaraj, et al. // *BMC Res Notes*. – 2014. – Vol. 7, no. – P. 387.
162. Monitoring the total available calmodulin concentration in intact cells over the physiological range in free Ca²⁺ / D. J. Black, Q. K. Tran and A. Persechini // *Cell Calcium*. – 2004. – Vol. 35, no. 5. – P. 415-425.
163. The relationship between the free concentrations of Ca²⁺ and Ca²⁺-calmodulin in intact cells / A. Persechini and B. Cronk // *J Biol Chem*. – 1999. – Vol. 274, no. 11. – P. 6827-6830.
164. Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications / R. Arnon and R. Aharoni // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2004. – Vol. 101 Suppl 2, no. – P. 14593-14598.
165. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system / L. Steinman // *Cell*. – 1996. – Vol. 85, no. 3. – P. 299-302.
166. Early reduction of NeuN antigenicity induced by soman poisoning in mice can be used to predict delayed neuronal degeneration in the hippocampus / J. M. Collombet, C. Masqueliez, E. Four, et al. // *Neurosci Lett*. – 2006. – Vol. 398, no. 3. – P. 337-342.
167. Catalytic antibodies: balancing between Dr. Jekyll and Mr. Hyde / A. Belogurov, Jr., A. Kozyr, N. Ponomarenko, et al. // *Bioessays*. – 2009. – Vol. 31, no. 11. – P. 1161-1171.
168. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis / E. S. Huseby, D. Liggitt, T. Brabb, et al. // *J Exp Med*. – 2001. – Vol. 194, no. 5. – P. 669-676.
169. The majority of infiltrating CD8+ T cells in the central nervous system of susceptible SJL/J mice infected with Theiler's virus are virus specific and fully functional / B. S. Kang, M. A. Lyman and B. S. Kim // *J Virol*. – 2002. – Vol. 76, no. 13. – P. 6577-6585.
170. Structural principles that govern the peptide-binding motifs of class I MHC molecules / C. Zhang, A. Anderson and C. DeLisi // *J Mol Biol*. – 1998. – Vol. 281, no. 5. – P. 929-947.
171. Structural studies of class I major histocompatibility complex proteins: insights into antigen presentation / A. C. Young, S. G. Nathenson and J. C. Sacchettini // *FASEB J*. – 1995. – Vol. 9, no. 1. – P. 26-36.

172. Altered properties of the branched chain amino acid-preferring activity contribute to increased cleavages after branched chain residues by the "immunoproteasome" / C. Cardozo and R. A. Kohanski // *J Biol Chem.* – 1998. – Vol. 273, no. 27. – P. 16764-16770.
173. Inactivation of a defined active site in the mouse 20S proteasome complex enhances major histocompatibility complex class I antigen presentation of a murine cytomegalovirus protein / G. Schmidtke, M. Eggers, T. Ruppert, et al. // *J Exp Med.* – 1998. – Vol. 187, no. 10. – P. 1641-1646.
174. Inhibitor-binding mode of homobelactosin C to proteasomes: new insights into class I MHC ligand generation / M. Groll, O. V. Larionov, R. Huber, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 103, no. 12. – P. 4576-4579.
175. Peptidylarginine deiminase 2 (PAD2) overexpression in transgenic mice leads to myelin loss in the central nervous system / A. A. Musse, Z. Li, C. A. Ackerley, et al. // *Dis Model Mech.* – 2008. – Vol. 1, no. 4-5. – P. 229-240.
176. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules / K. L. Rock, C. Gramm, L. Rothstein, et al. // *Cell.* – 1994. – Vol. 78, no. 5. – P. 761-771.
177. Characterization of peptidyl boronic acid inhibitors of mammalian 20 S and 26 S proteasomes and their inhibition of proteasomes in cultured cells / R. C. Gardner, S. J. Assinder, G. Christie, et al. // *Biochem J.* – 2000. – Vol. 346 Pt 2, no. – P. 447-454.
178. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, no. 5259. – P. 680-685.
179. Characterization of the proteasome using native gel electrophoresis / S. Elsasser, M. Schmidt and D. Finley // *Methods Enzymol.* – 2005. – Vol. 398, no. – P. 353-363.
180. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels / R. A. Reisfeld, U. J. Lewis and D. E. Williams // *Nature.* – 1962. – Vol. 195, no. – P. 281-283.
181. Mature myelin basic protein-expressing oligodendrocytes are insensitive to kainate toxicity / P. A. Rosenberg, W. Dai, X. D. Gan, et al. // *J Neurosci Res.* – 2003. – Vol. 71, no. 2. – P. 237-245.
182. Isolation and generation of human dendritic cells / S. Nair, G. E. Archer and T. F. Tedder // *Curr Protoc Immunol.* – 2012. – Vol. Chapter 7, no. – P. Unit7 32.
183. Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice. I. Induction of EAE with mouse spinal cord homogenate and myelin basic protein / T. Yasuda, T. Tsumita, Y. Nagai, et al. // *Jpn J Exp Med.* – 1975. – Vol. 45, no. 5. – P. 423-427.

184. Множественность форм протеасомы и некоторые подходы к их разделению / Т. М. А. Е.Б.Абрамова, П.А.Ерохов, Н.П.Шарова. // *Известия РАН. Серия биологическая.* – 2004. – Vol. no. 2. – P. 150-156.
185. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse / S. D. Miller and W. J. Karpus // *Curr Protoc Immunol.* – 2007. – Vol. Chapter 15, no. – P. Unit 15 11.
186. Effect of chemical modifications of myelin basic protein on its interaction with lipid interfaces and cell fusion ability / C. G. Monferran, B. Maggio and F. A. Cumar // *Mol Cell Biochem.* – 1986. – Vol. 70, no. 2. – P. 131-139.
187. Preparation of HeLa cell nuclear and cytosolic S100 extracts for in vitro splicing / A. Mayeda and A. R. Krainer // *Methods Mol Biol.* – 1999. – Vol. 118, no. – P. 309-314.