

ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ НЕОЭПИТОПОВ Fc ФРАГМЕНТОВ IgG ОБЛАДАЮЩИХ ИММУНОСУПРЕССИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ К УДАЛЕНИЮ МОДИФИЦИРУЮЩЕГО АГЕНТА, НЕОБХОДИМОГО ДЛЯ ИХ ФОРМИРОВАНИЯ

© 2019 г. А. Ю. Сидоров^{2*}, Ю. В. Коренчук², Л. В. Бедулева^{1,2},
И. В. Меньшиков^{1,2}, А. С. Терентьев^{1,2}, Т. В. Храмова^{1,2}

*E-mail: aneck4@rambler.ru

¹Удмуртский Федеральный Исследовательский центр Уральского Отделения Российской академии наук, Ижевск, Россия;

²ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия

Поступила: 29.05.2019. Принята: 30.06.2019

Fc фрагменты IgG, несущие неоэпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, обладают свойством подавлять аутоиммунные реакции и редуцировать симптомы в модели коллаген-индуцированного артрита крыс. Для индукции на Fc фрагментах IgG неоэпитопов используется модифицирующий агент, который может вызвать нежелательные реакции при введении в организм. Поэтому необходимо его удаление после модификации Fc фрагментов. Целью исследования было выяснить, сохраняются ли на Fc фрагментах IgG неоэпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, после удаления модифицирующего агента необходимого для их формирования. Обнаружено, что очистить Fc фрагменты IgG от модифицирующего агента можно методом эксклюзионной хроматографии на сорбенте Superdex 200. Удаление модифицирующего агента ведет к утрате неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором на Fc фрагментах IgG. Утрата неоэпитопов после удаления модифицирующего агента сопровождается окислением сульфгидрильных групп шарнирной области, имевшихся на Fc фрагментах, несущих исследуемые неоэпитопы. Данный факт свидетельствует о том, что для сохранения на Fc фрагментах IgG неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, должно поддерживаться восстановленное состояние остатков цистеина шарнирной области и использованный модифицирующий агент создает необходимые для этого условия.

Ключевые слова: Fc фрагменты IgG, ревматоидный фактор, неоэпитопы, сульфгидрильные группы, аутоиммунные реакции

DOI: 10.31857/S102872210007268-9

Адрес: 426034, Ижевск, ул. Университетская, 1, ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Сидоров Александр Юрьевич. Тел.: +79641842385

E-mail: aneck4@rambler.ru

Авторы:

Сидоров А. Ю., заведующий виварием ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия;

Коренчук Ю. В., магистрант 2 курса направления «Биология», Ижевск, Россия;

Бедулева Л. В., д.б.н., ведущий научный сотрудник Удмуртского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, профессор кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия;

Меньшиков И. В., д.б.н., главный научный сотрудник Удмуртского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, заведующий кафедрой

иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия;

Терентьев А. С., научный сотрудник Удмуртского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, инженер кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия;

Храмова Т. В., аспирант кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», научный сотрудник Удмуртского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Ижевск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее мы обнаружили, что обработка Fc фрагментов IgG восстанавливающими агентами

ведет к появлению у Fc фрагментов иммуносупрессивных свойств, в частности свойства подавлять аутоиммунные реакции. Было показано, что причиной приобретения Fc фрагментами IgG свойства подавлять аутоиммунные реакции является формирование на Fc фрагментах неопитопов под действием восстанавливающих агентов. Также было выяснено, что данные неопитопы распознаются аутоантителами, получившими название регуляторный ревматоидный фактор [1]. Регуляторный ревматоидный фактор — популяция антиидиотипических антител, присутствующих в норме в крови, общим свойством которых является наличие помимо индивидуальных паратопов, общего паратопа специфичного к неопитопам Fc фрагментов IgG [2]. Увеличение уровня регуляторного ревматоидного фактора у экспериментальных животных ассоциировано с устойчивостью к развитию некоторых экспериментально вызываемых аутоиммунных заболеваний и их ремиссией [2]. Иммунизация крыс Fc фрагментами IgG несущими неопитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, вызывает продукцию регуляторного ревматоидного фактора и редуцирует симптомы коллаген-индуцированного артрита [1]. Поэтому лимфоциты, продуцирующие регуляторный ревматоидный фактор можно рассматривать, как потенциальную терапевтическую биомишень при ревматоидном артрите, а Fc фрагменты, стимулирующие его продукцию, как средство лечения ревматоидного артрита. Модифицирующий агент, используемый для индукции на Fc фрагментах IgG неопитопов, может вызвать нежелательные реакции при введении в организм, поэтому необходимо его удаление после модификации. Однако удаление модифицирующего агента может вести к утрате сформированных неопитопов на Fc фрагментах IgG.

Целью исследования было выяснить сохраняются ли неопитопы после удаления модифицирующего агента, необходимого для их формирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Fc фрагменты IgG человека получали методом папаинового протеолиза Ig G. Очистку Fc фрагментов IgG проводили методами эксклюзионной хроматографии на колонке Sephacryl 26/400 и аффинной хроматографии на protein G и protein A сефарозе. Чистоту оценивали методом электрофоретического анализа в ПААГ.

Для формирования неопитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, Fc фрагменты обрабатывали модифицирующим агентом. Наличие эпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, на Fc фрагментах IgG определяли методом торможения реакции агглютинации танализованных эритроцитов, нагруженных IgG, вызванной сывороткой содержащей регуляторный ревматоидный фактор. Контролем служили препараты нативного IgG и забуференный физиологический раствор.

Чистоту Fc фрагментов IgG после удаления модифицирующего агента и состав получаемых при очистке фракций определяли методом электрофоретического анализа в ПААГ в диссоциирующих и диссоциирующих восстанавливающих условиях. Количество сульфгидрильных групп определяли методом Элмана.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом эксклюзионной хроматографии на сорбенте Superdex 200 смесь модифицирующего агента и Fc фрагментов IgG человека, несущих неопитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, удалось разделить на три фракции. Хроматографический профиль, полученный при разделении смеси Fc фрагментов и модифицирующего агента представлен на **Рисунке 1**. Первая фракция представлена белками с молекулярной массой более 150 кДа, вторая — 100–40 кДа, третья — менее 40 кДа.

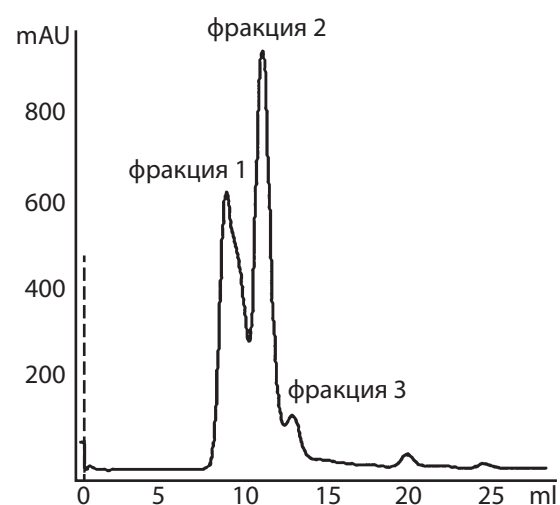


Рисунок 1. Эксклюзионная хроматография на колонке Superdex 200 10/300 смеси Fc фрагментов IgG человека, несущих неопитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, и модифицирующего агента.

Электрофоретический анализ фракций в градиентном ПААГ (3–15%) в диссоциирующих и диссоциирующих восстанавливающих условиях, показал, что первая фракция представлена полимерами Fc фрагментов, вторая – мономерами Fc фрагментов, третья содержала модифицирующий агент. Таким образом, эксклюзионная хроматография на сорбенте Superdex 200 позволяет эффективно удалять модифицирующий агент из смеси с Fc фрагментами IgG человека и получить Fc фрагменты IgG чистотой >95% (по данным электрофоретического анализа в ПААГ). Кроме того, хроматографический анализ показал, что Fc фрагменты IgG после обработки модифицирующим агентом находятся как в мономерной, так и в полимерной формах. Чувствительность полимеров Fc фрагментов к 2-меркаптоэтанолу свидетельствует о том, что они образованы на основе межмолекулярных дисульфидных связей.

Наличие неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, на Fc фрагментах IgG человека до и после удаления модифицирующего агента было изучено методом торможения реакции агглютинации танизированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов, вызванной регуляторным ревматоидным фактором. Эпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, имевшиеся на Fc фрагментах после обработки модифицирующим агентом (Рисунок 2), не обнаружены ни на полимерах Fc фрагментов IgG

человека, содержащихся в первой фракции, ни на мономерах Fc фрагментов IgG человека, содержащихся во второй фракции, полученных эксклюзионной хроматографией на сорбенте Superdex 200 (Рисунок 2). В составе третьей фракции, содержащей модифицирующий агент, также не выявлено носителей неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором (Рисунок 2). Таким образом, Fc фрагменты IgG несущие неоэпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, утратили данные эпитопы после удаления модифицирующего агента из смеси с Fc фрагментами. Следовательно, модифицирующий агент необходим не только для формирования неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, на Fc фрагментах IgG человека, но и их сохранения.

Исследование количества SH групп показало, что на Fc фрагментах IgG человека, несущих неоэпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, приходится в среднем $2,89 \pm 0,74$ SH группы. После удаления модифицирующего агента из смеси с Fc фрагментами IgG человека методом эксклюзионной хроматографии на сорбенте Superdex 200 количество свободных сульфгидрильных групп на Fc фрагментах IgG человека во фракции полимеров составило $0,43 \pm 0,18$ SH группы на молекулу Fc, во фракции мономеров $0,11 \pm 0,05$ SH групп на молекулу Fc фрагментов. Результаты представлены на Рисунке 3. Таким образом, утрата Fc фраг-

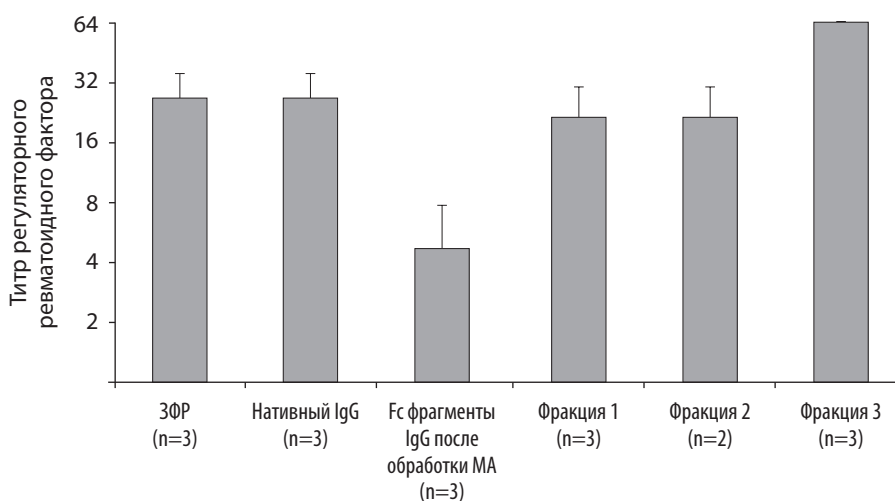


Рисунок 2. Ингибирование агглютинации танизированных нагруженных IgG человека эритроцитов, вызванной регуляторным ревматоидным фактором, образцами Fc фрагментов IgG человека. Результаты представлены как среднее ± SD. n- количество независимо полученных образцов. МА-модифицирующий агент. 3ФР – забуференный физиологический раствор.

ментами неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, после удаления модифицирующего агента, сопровождается окислением сульфгидрильных групп.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружено, что очистить Fc фрагменты IgG от модифицирующего агента, необходимого для формирования на Fc фрагментах неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, можно методом эксклюзионной хроматографии на сорбенте Superdex 200. Удаление модифицирующего агента ведет к утрате неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором на Fc фрагментах IgG. Утрата неоэпитопов после удаления модифицирующего агента сопровождается окислением сульфгидрильных групп шарнирной области, имевшихся на Fc фрагментах, несущих неоэпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором. Так, если Fc фрагменты IgG экспонирующие неоэпитопы содержат около 3 свободных SH групп, то после удаления модифицирующего агента и утраты неоэпитопов в среднем обнаруживается менее 1 группы на молекулу Fc фрагментов. Данный факт свидетельствует о том, что для сохранения на Fc фрагментах IgG неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, должно поддерживаться восстановленное состояние остатков цистеина шарнирной области и использованный модифицирующий агент создает необходимые для этого

условия. Так как используемый модифицирующий агент может при введении в организм вызывать нежелательные реакции, необходим поиск такого модифицирующего агента, который обладает свойством индуцировать формирование неоэпитопов распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором на Fc фрагментах, но безопасен для организма человека.

ВЫВОДЫ

1. Очистка Fc фрагментов IgG, несущих неоэпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, от модифицирующего агента, необходимого для их формирования, ведет к утрате исследуемых неоэпитопов и потере Fc фрагментами иммуносупрессивных свойств.

2. Для сохранения на Fc фрагментах IgG неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, должно поддерживаться восстановленное состояние остатков цистеина шарнирной области и использованный модифицирующий агент создает необходимые для этого условия.

(Работа выполнена в рамках научного проекта РФФИ № 18–315–00424, и поддержана Стипендией Президента Российской Федерации № СП-1630.2018.4)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Сидоров А. Ю., Бедулева Л. В., Меньшиков И. В., Терентьев А. С., Столярова Е. Ю., Абишева Н. Н. Fc фрагменты IgG как индуктор регуляторного рев-

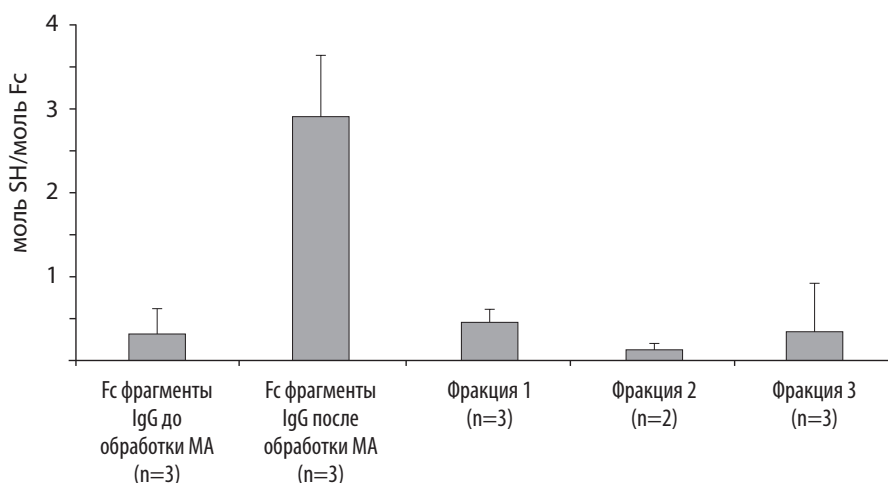


Рисунок 3. Количество свободных SH групп на Fc фрагментах IgG человека. Результаты представлены как среднее \pm SD. n – количество независимо полученных образцов. МА-модифицирующий агент. Фракции 1, 2, 3 – фракции полученные при разделении смеси Fc фрагментов и МА методом эксклюзионной хроматографии. Фракция 1 и 2 содержат полимеры и мономеры Fc фрагментов IgG соответственно, фракция 3 – МА.

матоидного фактора и перспективный терапевтический агент для лечения ревматических заболеваний. 2017. Международный журнал биологических макромолекул, 95, 938–945. [Sidorov A., Beduleva L., Menshikov I., Terentiev A., Stolyarova E., Abisheva N. Fc fragments of immunoglobulin G are an inductor of regulatory rheumatoid factor and a promising therapeutic agent for rheumatic diseases. 2017. International Journal of Biological Macromolecules, 95, 938–945].

2. Бедулева Л. В., Меньшиков И. В., Столярова Е. Ю., Фомина К. В., Лобанова О. В., Иванов П. А., Терентьев А. С. Ревматоидный фактор в идиотипической регуляции аутоиммунитета. Международный журнал ревматических заболеваний. 2015, 18, 408–420. [Beduleva L., Menshikov I., Stolyarova E., Fomina K., Lobanova O., Ivanov P., Terentiev A. Rheumatoid factor in idiotypic regulation of autoimmunity. 2015. Int J Rheum Dis, 18, 408–420.]

THE STABILITY OF NEOEPITOPES RECOGNIZED BY REGULATORY RHEUMATOID FACTOR AFTER REMOVING THE MODIFYING AGENT REQUIRED FOR THEIR FORMATION

© 2019 A. Yu. Sidorov^{2*}, Yu. V. Korenchuk², L. V. Beduleva^{1,2}, I. V. Menshikov^{1,2}, A. S. Terentiev^{1,2}, T. V. Khramova^{1,2}

*E-mail: aneck4@rambler.ru

¹Udmurt Federal Research Center, Izhevsk, Russia;

²Udmurt State University, Izhevsk, Russia

Received: 29.05.2019. Accepted: 30.06.2019

Fc fragments of IgG exposing neoepitopes recognized by the regulatory rheumatoid factor have the ability to suppress autoimmune reactions and reduce symptoms of rat collagen-induced arthritis. To induce neoepitopes in Fc fragments of IgG a modifying agent is used. This modifying agent can cause undesirable reactions when introduced into the body. Therefore it is necessary to remove it after Fc fragments modifying. The aim of the study was to find out whether neoepitopes recognized by the regulatory rheumatoid factor remain on Fc fragments of IgG after removal of the modifying agent. It has been found that Fc IgG fragments can be purified from a modifying agent by size exclusion chromatography on a Superdex 200. Removal of the modifying agent leads to the loss of neoepitopes recognized by the regulatory rheumatoid factor on Fc IgG fragments. The loss of neoepitopes after the removal of the modifying agent is accompanied by the oxidation of the sulfhydryl groups of the hinge region which were present on Fc fragments carrying the neoepitopes. This fact suggests that in order to preserve on the Fc fragments of IgG neoepitope recognized by the regulatory rheumatoid factor the reduced state of cysteine residues of the hinge region must be maintained and the modifying agent used creates the necessary conditions for this.

Key words: Fc fragments of IgG, rheumatoid factor, neoepitopes, sulfhydryl groups, autoimmunity

Authors:

Sidorov A. Yu., ☒ Head of Vivarium, Udmurt State University, Izhevsk, Russia.

426034, Izhevsk, University St, 1, Udmurt State University. Phone: +79641842385, **E-mail:** aneck4@rambler.ru;

Korenchuk Yu. V., undergraduate student, Udmurt State University, Izhevsk, Russia;

Beduleva L. V., Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Professor of Immunology and Cell Biology Department, Udmurt State University, Izhevsk, Russia;

Menshikov I. V., Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher, Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Head of Immunology and Cell Biology Department, Udmurt State University, Izhevsk, Russia;

Terentiev A. S., Researcher, Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Engineer of Immunology and Cell Biology Department, Udmurt State University, Izhevsk, Russia;

Khramova T. V., Postgraduate Student, Udmurt State University, Researcher of Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russia.