

Исследование структуры Fc фрагментов IgG крыс, несущих нео-эпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором

А. Ю. Сидоров*, Л. В. Бедулева, М. П. Ирина, А. С. Терентьев,
И. В. Меньшиков

Удмуртский государственный университет

Россия, Удмуртская Республика, 426034 г. Ижевск, улица Университетская, 1.

**Email: aneck4@rambler.ru*

Обнаружено, что носителями нео-эпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, являются агрегаты Fc фрагментов IgG крыс, формирующиеся на основе гидрофобных взаимодействий.

Ключевые слова: Fc фрагменты IgG крыс, агрегаты, нео-эпитопы, регуляторный ревматоидный фактор.

Недавно был обнаружен новый фактор регуляции аутореактивности, продукция которого предотвращает развитие экспериментально-вызванных аутоиммунных заболеваний, а также ассоциирована с их ремиссией [1, 2]. Новый фактор регуляции аутореактивности получил название регуляторный ревматоидный фактор. Было показано, что иммунизация Fc фрагментами IgG крысы, несущими нео-эпитопы, распознаваемые регуляторным фактором, эффективно подавляет коллаген-индуцированный артрит крыс. Таким образом, лимфоциты, продуцирующие регуляторный ревматоидный фактор, являются потенциальной биомишенью, стимуляция которой может вести к эффективному подавлению аутоиммунных реакций. Потенциальным терапевтическим агентом, который будет специфически воздействовать на эту биомишень, являются Fc фрагменты IgG, несущие нео-эпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором [3].

В предварительных исследованиях было показано, что формирования данных эпитопов на Fc фрагментах IgG крысы можно добиться инкубацией последних с плазмой крови крыс, при этом носителем эпитопов является образующийся в ходе такой инкубации преципитат. Однако структура осаждающихся агрегатов и механизм их формирования не ясны. Они могут представлять собой иммунные комплексы, образованные между Fc фрагментами IgG и регуляторным ревматоидным фактором плазмы, либо агрегаты на основе гидрофобных взаимодействий [4] или полимеры Fc фрагментов, образованные сульфгидрильными группами шарнирной области [5].

Методы: о наличии исследуемых эпитопов судили по способности Fc фрагментов подавлять реакцию агглютинации танализированных эритроцитов, нагруженных IgG кры-

сы, вызванную регуляторным ревматоидным фактором. Иммунизацией интактных крыс исследовали способность Fc фрагментов IgG крысы, вызывать продукцию регуляторного ревматоидного фактора. Методом электрофореза в градиентном и однородном ПААГ в восстанавливающих и диссоциирующих условиях исследовали фракционный состав Fc фрагментов IgG и образуемого ими осадка.

Наличие эпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором на Fc фрагментах IgG крыс, было исследовано в день получения Fc фрагментов IgG, после их инкубации при 37 °C в течение суток, и после их инкубации с плазмой крови крыс при 37 °C в течение суток.

Обнаружено, что некоторые образцы свежевыделенных Fc фрагментов IgG, образцы Fc фрагментов, инкубированных при 37 °C в течение суток, а также осадок, полученный при инкубации Fc фрагментов с плазмой интактных крыс, подавляют связывание регуляторного ревматоидного фактора *in vitro*, вызывают его продукцию у крыс на 7 день после иммунизации, что доказывает наличие на исследованных образцах нео-эпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором. IgG крысы, Fab фрагменты IgG крысы не конкурируют за связывание с регуляторным ревматоидным фактором и не вызывают его продукцию у крыс, следовательно, не несут исследуемых эпитопов, также как и некоторые образцы свежих Fc фрагментов IgG крысы. В плазме крови, смешанной с забуференным физиологическим раствором, осадок не формируется, что свидетельствует, что причиной его формирования являются Fc фрагменты IgG крысы. Таким образом, Fc фрагменты IgG крысы, инкубированные при 37 °C, осадок, выпавший при инкубации Fc фрагментов IgG с плазмой крови крыс, некоторые образцы свежих Fc фрагментов IgG несут нео-эпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором.

Сравнительный анализ электрофореграмм свежих Fc фрагментов, несущих эпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором и не имеющих их, показал, что в восстанавливающих условиях Fc фрагменты IgG, несущие исследуемые нео-эпитопы, помимо типичных полос в области 25 кДа, образуют полосы в области соответствующей подвижности белков с молекулярной массой от 50 до 150 кДа. Fc фрагменты, не имеющие нео-эпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, не образуют дополнительных полос помимо типичных. Полосы в области 50–150 кДа образуют также Fc фрагменты IgG, инкубированные при 37 °C и как было показано выше, экспонирующие нео-эпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором.

Электрофоретический анализ осадка, образующегося при инкубации Fc фрагментов IgG крысы и плазмы крови крысы, выявил, что осадок образует полосы в области Fc фрагментов IgG крысы и многочисленные полосы в области соответствующей по-

движности белков с молекулярной массой от 30 до 150 кДа. Наличие полос в области, точно соответствующей подвижности Fc фрагментов в восстанавливающих условиях свидетельствует о наличии в составе осадка Fc фрагментов IgG.

Таким образом, все исследованные образцы Fc фрагментов, несущие нео-эпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, включая осадок Fc фрагментов, формирующийся при их инкубации с плазмой, за исключением Fc фрагментов, не несущих исследуемых эпитопов, образуют в восстанавливающих условиях полосы, соответствующие подвижности белков с молекулярной массой от 50 до 150 кДа. Так как свежие Fc фрагменты, и Fc фрагменты, инкубированные при 37 °C являются чистыми препаратами, не содержат в своем составе примесных белков, обнаруженные в восстанавливающих условиях полосы молекулярной массой от 50 до 150 кДа могут быть образованы только Fc фрагментами IgG крысы. Сходство электрофореграмм чистых Fc фрагментов и осадка, полученного Fc фрагментами при инкубации с плазмой, позволяет предполагать, что молекулярные структуры подвижностью от 50 до 150 кДа в осадке также образованы Fc фрагментами, а не белками плазмы. Кроме того электрофоретический анализ не выявил ни тяжелых, ни легких цепей иммуноглобулинов в составе осадка, образованного при инкубации Fc фрагментов с плазмой. Это указывает на то, что осадок не содержит иммуноглобулинов и, следовательно, образован не иммунными комплексами. Таким образом, можно предполагать, что носителями эпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором являются надмолекулярные структуры Fc фрагментов IgG крысы, которые в ходе электрофоретического анализа в ПААГ в восстанавливающих условиях образуют ряд полос молекулярной массой от 30 до 150 кДа.

Учитывая физико-химические свойства Fc фрагментов IgG, структуры данной молекулярной массы, несущие эпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, могут быть сформированы Fc фрагментами IgG крысы или на основе ковалентных связей или гидрофобных взаимодействий и соответственно могут формировать полимеры или агрегаты. Если бы надмолекулярные структуры Fc фрагментов IgG, несущие нео-эпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, представляли собой полимеры, то после обработки 2-меркаптоэтанолом при электрофоретическом анализе в восстанавливающих условиях препараты Fc фрагментов IgG крысы должны были образовывать только полосы, характерные для одиночных цепочек Fc фрагментов молекулярной массой 25 кДа. Наличие полос в области характерной для белков массой от 30 кДа до 150 кДа указывает на то, что Fc фрагменты, несущие нео-эпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, не являются полимерами на основе дисульфидных связей, а представляют собой агрегаты Fc фрагментов IgG, образованные на основе гидрофобных взаимодействий Fc фрагментов.

Выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00424.

Литература

1. Beduleva, L. Rheumatoid factor in idiotypic regulation of autoimmunity // L. Beduleva, I. Menshikov, E. Stolyarova et. al. International Journal of Rheumatic Diseases. – 2015. V. 18. №4. P. 408–420.
2. Menshikov I. The idiotypic network in the regulation of autoimmunity: Theoretical and experimental studies // Beduleva L., Frolov M., Abisheva N., Khramova T., Stolyarova E., Fomina K. Journal of Theoretical Biology. – 2015. V. 375. P. 32–39.
3. Sidorov, A. Fc fragments of immunoglobulin G are an inductor of regulatory rheumatoid factor and a promising therapeutic agent for rheumatic diseases // A. Sidorov, L. Beduleva, I. Menshikov et. al. Int., J Biol Macromol. – 2017. P. 938–945.
4. Helk, B. Aggregation-Prone Motifs in Human Immunoglobulin G // Naresh Chennamsetty. B. Helk, V. Voynov, V. Kayser, L. Bernhardt L. J. Mol. Biol. – 2009. V. 391. P. 404–413.
5. Carter, P. J. Potent antibody therapeutics by design // P. J. Carter. Nat. Rev. Immunol. – 2006. V. 6. P. 343–357.

Study of the structure of rats IgG Fc fragments exposing neo-epitopes recognized by the regulatory rheumatoid factor

A. Sidorov*, L. Beduleva, M. Irina, A. Terentiev, I. Menshikov

Udmurt State University

1 Universitetskaya Street, 426034 Izhevsk, Udmurt Republic, Russia.

**Email: aneck4@rambler.ru*

It was found that the Fc fragments of rat IgG exposing neo-epitopes recognized by the regulatory rheumatoid factor are aggregates formed due to hydrophobic interactions.

Keywords: Fc fragments rats IgG, regulatory rheumatoid factor, neo-epitope, aggregates.