

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. АКАДЕМИКОВ  
М.М.ШЕМЯКИНА И Ю.В.ОВЧИННИКОВА

9  $\frac{09 - 4}{3866}$

*На правах рукописи*

ЛЫСЕНКО Андрей Александрович

АНАЛИЗ РОЛИ ДИСТАЛЬНЫХ ДОМЕНОВ ДЕСМОГЛЕИНА 3  
В НАРУШЕНИИ АДГЕЗИИ МЕЖДУ КЕРАТИНОЦИТАМИ ПРИ  
ПУЗЫРЧАТКЕ ✓

специальность – 03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2008 г.

Работа выполнена в лаборатории клеточных взаимодействий Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской Академии Наук

**Научный руководитель:**

Свирищевская Елена Викторовна, кандидат биологических наук

**Официальные оппоненты:**

Таха Татьяна Владимировна, кандидат медицинских наук;

Лебедев Юрий Борисович, доктор биологических наук

**Ведущая организация:**

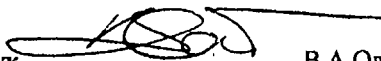
Государственное учреждение Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова Российской академии медицинских наук (ГУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН).

Защита состоится «18» февраля 2009 года в 10 часов на заседании диссертационного совета при Институте биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии Наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Автореферат разослан «15» января 2009г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук



В.А.Олейников

## ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы Пузырчатка является аутоиммунным заболеванием, при котором наблюдается расслоение эпидермиса с образованием язв на коже и слизистых оболочках. Аутоантигеном при пузырчатке являются белки десмосом десмогленины (ДСГ). Связывание аутоантител с белками-мишенями приводит к нарушению межклеточной адгезии – акантолизу. Существует две основные формы пузырчатки: при вульгарной пузырчатке (ВП) аутоантитела распознают ДСГ3, а при листовидной пузырчатке (ЛП) – ДСГ1. В результате на коже и слизистых образуются многочисленные эрозийные бляшки или пузыри, заполненные жидкостью. Заболевание осложняется тем, что образующиеся пузыри часто вскрываются, что служит причиной сопутствующих инфекций. До появления кортикостероидных препаратов пузырчатка часто заканчивалась летальным исходом. На настоящий момент заболевание контролируется практически пожизненным приемом преднизолона; случаи излечения исключительно редки.

В России ВП составляет более 90% всех случаев пузырчатки, что делает изучение этой формы пузырчатки наиболее актуальным для нашей страны. В ряде стран (Бразилия, Колумбия) существует разновидность эндемичной ЛП. При ВП аутоантитела направлены к ДСГ3 почти у 100% больных и к ДСГ1 – примерно у 50-80% больных. При листовидной пузырчатке – у всех больных выявляются антитела к ДСГ1 и редко – к ДСГ3. Характер повреждения кожи – акантолиз – различается при этих формах: при ВП наблюдают формирование пузырей в основном на слизистых оболочках и в надбазальном слое кожи. При ЛП пузыри формируются в поверхностных слоях эпидермиса кожи, что вызывает отслаивание ороговевающих слоев, откуда и возникло название – листовидная пузырчатка. При ЛП слизистые оболочки не повреждаются.

Десмогленины входят в состав десмосом, которые формируют межклеточные адгезионные контакты в эпителии, подвергающемуся механической нагрузке, например, в эпителии кожи, слизистой оболочки полости рта и др. Внеклеточная часть десмосом формируется только двумя белками: десмогленинами и десмоколлинами, которые относятся к кадгериновому семейству. Механизм нарушения межклеточной адгезии при пузырчатке до сих пор остается непонятным и дискуссионным. Для его

понимания требуется детальное изучение механизма сборки и функционирования десмосом.

В настоящее время ген десмоглеина 3 клонирован и полностью охарактеризован. Определена аминокислотная последовательность белка. Получены рекомбинантные белки, содержащие различные участки молекулы десмоглеина в различных экспрессионных системах.

Хотя достоверно показана роль аутоантител в развитии пемфигуса, истинная этиологическая причина по-прежнему остается неясной. Показано, что определенную роль в развитии данного заболевания играют наследственные факторы, поскольку частота встречаемости ВП, в отличие от ЛП, коррелирует с частотой некоторых аллелей главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) II класса. Данная работа является продолжением исследований по механизмам патогенеза пузырчатки и анализу роли аутоантител к дистальным доменам в нарушении адгезии между кератиноцитами.

**Цель работы:** изучить механизмы патогенности аутоантител к различным доменам десмоглеина 3 в моделях *in vitro*.

**В рамках данной работы были поставлены следующие задачи:**

1. Получить в бакловирусной системе фрагменты десмоглеина 3 человека, соответствующие доменам 1, 2, 1-2 и 1-5 внеклеточной части молекулы ДСГЗ.
2. С помощью рекомбинантных белков изучить доменную специфичность аутоантител больных пузырчаткой.
3. Теоретически определить локализацию эпитопов ДСГЗ, распознаваемых аутоантителами больных.
4. Разработать и охарактеризовать модели *in vitro* для анализа механизмов патогенеза пузырчатки.
5. Получить антитела к различным доменам десмоглеина 3 и охарактеризовать их патогенность с использованием эксплантатов кожи и культур кератиноцитов человека.
6. Определить механизмы нарушения адгезии патогенными антителами к ДСГЗ.

### Научная новизна

1. Впервые в России было осуществлено клонирование в бакуловирусной системе генных фрагментов десмоглеина 3, кодирующих внеклеточную часть молекулы и ее первые два домена.
2. Впервые проведена попытка идентифицировать патогенные эпитопы ДСГЗ методами молекулярного моделирования. Анализ литературных данных позволил подтвердить, что антитела 50% больных ВП распознают один из двух предсказанных патогенных эпитопов.
3. В моделях эксплантатов кожи *in vitro* впервые показано, что антитела к ДЗ-5 ДСГЗ могут быть патогенными.
4. Впервые показано, что состояние гиперадгезии клеток линии кератиноцитов человека HaCaT вызвано увеличением числа десмосом на их поверхности.
5. Также впервые показано, что снижение количества десмосом при понижении концентрации кальция или блокаде синтеза десмосом *de novo* приводит к нарушению адгезии между клетками HaCaT патогенными антителами к ДСГЗ.

Практическая значимость. Картированы патогенные и непатогенные эпитопы ДСГЗ, что позволяет в дальнейшем разработать протокол иммунизации пептидами, соответствующими непатогенным участкам, с целью конкурентного ингибирования связывания патогенных аутоантител с аутоантигеном. Полученные в данной работе фрагменты генов, кодирующие домены 1, 2 и 1-5 молекулы ДСГЗ, ранее были клонированы в дрожжевой системе экспрессии и получены соответствующие белки. На основе дрожжевого белка, содержащего 1-2 домены ДСГЗ, разработан диагностикум для анализа циркулирующих аутоантител к десмоглеину человека.

Внедрение в практику. Результаты настоящего исследования внедрены в практику Отдела иммунологии ИБХ РАН и кафедры кожных и венерических болезней лечебного факультета РГМУ.

Апробация работы и публикации. Материалы диссертации доложены и обсуждены на заседаниях Отдела иммунологии ИБХ РАН, на 7-й летней школе по иммунологии им. Джона Хамфри (ИБХ РАН, Москва, Россия, 2005), на XXII Конгрессе Европейской Академии аллергологии и клинической иммунологии (Франция, Париж 2003), на 16-ом Европейском Конгрессе по иммунологии (Франция,

Париж, 2006), на Всероссийской конференции с международным участием «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», 2004, 2006, 2007, 2008.

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ в центральной печати и материалах российских и зарубежных научно-практических конференций и съездов.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, 3 глав результатов собственных исследований, обсуждения полученных данных, основных выводов, списка литературы. Работа изложена на 147 страницах, содержит 40 рисунков и 16 таблиц. Список литературы включает 140 ссылок на литературные источники.

### **Материалы и методы**

Получение рекомбинантных белков. Белки Д1, Д2, Д1-2 и Д1-5, соответствующие различным доменам белка ДСГЗ человека, были получены в бакуловирусной системе. Полученную ранее кДНК (получена О.Д. Коцаревой) использовали для проведения полимеразной цепной реакции с праймерами, специфичными для получения соответствующих генных фрагментов. Специфические пары праймеров использованы для клонирования соответствующих фрагментов в рFastBac HTb вектор (Invitrogen), используемый в бакуловирусной системе экспрессии Bac-to-Bac. Рекомбинантные вектора были сиквенированы, чтобы проверить правильность вставки кДНК и наличие мутаций. Были отобраны вектора, имеющие правильную рамку считывания и не имеющие мутаций. Хроматографическое выделение рекомбинантных белков осуществляли с использованием сорбента Ni-NTA агарозы согласно рекомендации производителей.

Клеточные линии. Клетки насекомых Sf9 наращивали в среде TC100 с 10% фетальной сыворотки (ФС) и 300 мкг/мл L-глутамина и использовали для получения рекомбинантных белков. Клетки линии кератиноцитов человека HaCaT и A431 культивировали в среде DMEM и RPMI-1640, соответственно, дополненных 10% ФС, глутамином, антибиотиками и 50 мМ 2-меркаптоэтанола. Для анализа с помощью конфокальной микроскопии клетки наращивали на покровных стеклах.

Сыворотки больных ВП. Сыворотки от 25 больных ВП были получены в НИИ ЦКВИ. Донорскую кровь брали у студентов РГМУ и сотрудников лаборатории.

Получение кроличьих антител к фрагментам ДСГЗ. Кроликов иммунизировали внутримышечно рекомбинантными белками Д1-2 и Д1-5. Первичная иммунизация проводилась с использованием полного адьюванта Фрейнда. Первичная доза составляла 1мг/ кролика для белка Д1-2 и 0,5 мг/ кролика для белка Д1-5. При последующих иммунизациях использовался неполный адьювант Фрейнда. Иммунизация проводилась 6 раз с интервалами 1-2 недели до получения высоких титров антител. Сыворотку собирали из ушной вены через неделю после 6 иммунизации.

Антитела. В работе использовали немеченные моноклональные мышинные антитела к ДСГЗ, ДСГ1 и десмоколлину 2/3 (ДСК2/3) человека (Zymed Laboratories, USA); биотинилированные антитела к IgG человека (Sigma); антитела к IgG мыши, меченные Alexa Fluor 488 (Pharmingen, США); стрептавидин-FITC; антитела к IgG кролика, меченные FITC (Sigma).

Твердофазный иммуно-ферментный анализ (ИФА). Белки наносили на 96-луночные планшеты для ИФА в концентрации 10 мкг/мл. В качестве проявляющих использовали антитела против IgG человека или кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена. В качестве субстрата использовали ортофенилендиамин (Sigma).

Анализ участия антител к ДСГЗ в акантолизе кожи. Образцы кожи человека, полученные хирургическим путем, или образцы кожи мышат инкубировали в полной среде RPMI 1640 с различными антителами (60 мкг/мл) в течение двух суток. После этого образцы отмывали три раза в PBS и фиксировали в 3 % растворе формальдегида, затем образцы отмывали, инкубированы в течение ночи в 15% растворе сахарозы, помещали в среду для приготовления криосрезов Killik (Bio-Optica, Милан, Италия) и замораживали при -135°C. Криосрезы были приготовлены с помощью криотома. Толщина криосрезов – 8 и 10 мкм.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Клетки линий HaCaT и A431 выращивались на покровных стеклах до образования плотного монослоя. Клетки инкубировались с соответствующими первыми антителами при +37°C, отмывались и фиксировались 20-30 мин. в 1% растворе формальдегида, затем клетки отмывались и инкубировались со вторыми антителами, конъюгированными с флюорохромом, отмывались и заливались полимеризующейся средой Mowiol 4.88 (Calbiochem). Образцы анализировались с помощью конфокального сканирующего микроскопа Nikon TE 2000 Eclipse (Япония),

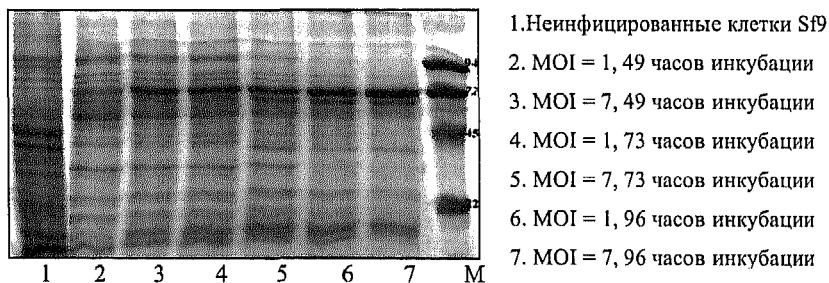
снабженного синим и зеленым лазерами. Для визуализации ядер клетки инкубировали 15 мин при 37°C с 5 мкг/мл 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI).

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием пакета MS Office Excell по t-критерию Стьюдента.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Результаты исследований

Получение рекомбинантных белков Д1, Д2, Д1-2 и Д1-5. Для получения рекомбинантных белков была использована система Bac-to-Bac (Invitrogen, USA). При отборе рекомбинантных вирусных векторов были использованы два метода оценки – метод бело-голубой селекции и ПЦР. Полученные вирусные вектора были использованы для трансфекции клеток Sf9 и получения первого поколения вирусов. Первое поколение использовали для заражения клеток и получения второго поколения вирусов. Для третьего поколения вирусов определяли количество вирусных частиц с помощью модифицированного метода конечных разведений. После определения титра вирусы были использованы для получения рекомбинантных белков. Предварительно была проведена время- и дозо-зависимая оценка экспрессии рекомбинантных белков. Пример такой оценки показан на рисунке 1, где исследовался уровень экспрессии для рекомбинантного белка Д1-5 (M<sub>r</sub> = 72 кДа). Так как рекомбинантные белки не секретируются в среду, то время экспрессии белков ограничивалась жизнеспособностью клеток (не более 96 часов с момента заражения вирусом).

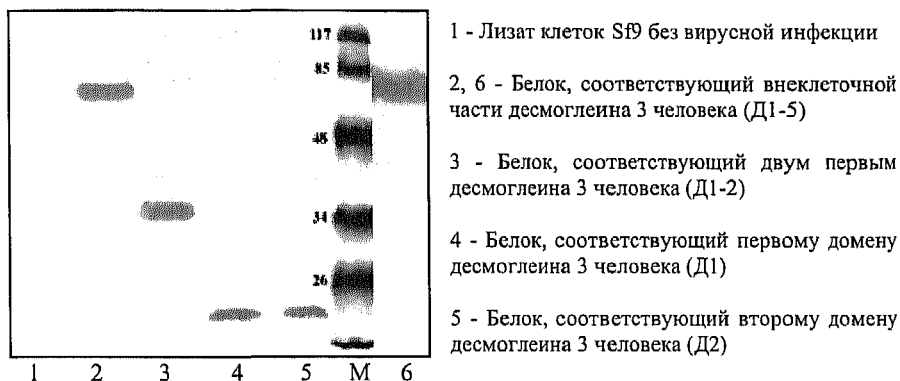


**Рис.1. Зависимость продукции белка от множественности инфекции (MOI, количество вирусных частиц/клетку) и времени инкубации.** Гель-электрофорез в денатурирующих условиях, 15% гель. М- маркер молекулярной массы, кДа.

Для клонирования нами были выбраны 4 фрагмента кДНК внеклеточной части ДСГ3: кодирующий первый, второй, 1 и 2, а также все пять внеклеточных доменов



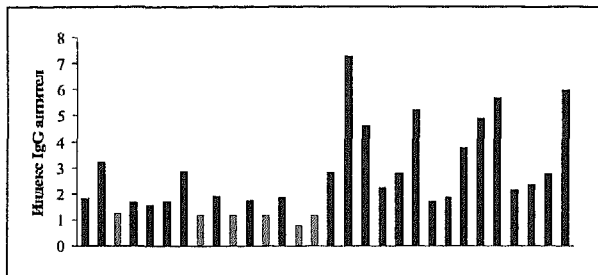
белка ДСГЗ. Для наработки и получения рекомбинантных белков, соответствующих различным фрагментам десмоглеина 3 человека, использовали суспензионную культуру клеток Sf9. Выделение рекомбинантных белков проводилось с использованием Ni-NTA аффинной хроматографии из лизатов клеток насекомых. Для определения молекулярных масс полученных белков использовали неградиентный электрофорез в 15% ПААГе. Белки были охарактеризованы с помощью антител к N-концевому 6x His эпиту. Молекулярная масса белков оказалась в пределах ожидаемой для всех четырех белков (рис.2, дорожки 1-5). Идентификация полученного белка была проведена также с использованием коммерческих моноклональных антител к ДСГЗ (рис.2, дорожка 6). Полученные данные подтвердили идентичность полученных рекомбинантных белков ДСГЗ человека.



**Рис.2. Иммуноблот анализ. Рекомбинантные белки, полученные в бакуловирусной системе экспрессии.** Дорожки 1-5 - антитела к 6xHis на N-конце, конъюгированные с пероксидазой хрена (1:2100). Дорожка 6 - моноклональные антитела мыши к ДСГЗ человека.

#### *Распознавание различных доменов ДСГЗ сыворотками больных пузырчаткой*

Идентификацию эпитопов, распознаваемых сыворотками больных пузырчаткой, проводили с помощью блотинга и иммуно-ферментного анализа с использованием рекомбинантных белков для чего использовали 25 сывороток больных вульгарной пузырчаткой и 10 сывороток доноров. Показали, что все сыворотки распознавали полноразмерный белок Д1-5, 24 сыворотки распознавали белок Д1-2 (рис.3).



**Рис. 3. Распознавание белка Д1-2 сыворотками больных ВП.** Серая зона соответствует индексу 1,1. Серым цветом обозначены отрицательные сыворотки.

Полученные данные показали, что 80% сывороток больных преимущественно распознают два дистальных домена ДСГ3. Соответственно, по крайней мере, в 20% случаев аутоантитела направлены не к дистальным доменам, принимающим участие в формировании адгезивного контакта между молекулами десмоглеина 3. Эти данные хорошо согласуются с данными других авторов, где показано, что сыворотки больных ВП распознают 1 и 2 домены ДСГ3 в 60-89% (Ishii et al., 1997, Sekiguchi et al., 2001; Tsunoda et al., 2003). Механизмы действия антител, направленных как к дистальным, так и проксимальным доменам на настоящий момент являются дискуссионными.

#### *Идентификация В-эпитопов ДСГ3*

Сыворотки больных ВП и ЛП распознают только специфичные для данной формы заболевания белки. ДСГ1 и ДСГ3, являющиеся аутоантигенами при ЛП и ВП, соответственно, имеют высокую степень гомологии между собой. Поэтому с помощью анализа аминокислотной последовательности можно выявить негомологичные участки ДСГ1 и ДСГ3 и попытаться идентифицировать эпитопы именно в этих участках. По литературным данным также известно, что в адгезионных взаимодействиях основную роль играет первый домен, что позволяет говорить о важности эпитопов патогенных антител именно в первом домене. На рисунке 4 приведено сравнение аминокислотных последовательностей первого домена ДСГ1 и ДСГ3, где черным шрифтом отмечены различающиеся аминокислоты, а зеленым фоном выделены близкие по свойствам аминокислоты замены, например, положительно заряженные аргинин R<sup>90</sup> на положительно заряженный лизин K<sup>90</sup>.



## *Пространственная локализация эпитопов ДСГЗ*

Картирование эпитопов ДСГЗ можно провести, посмотрев локализацию данных негомологичных участков на поверхности молекулы ДСГЗ, для чего необходима трехмерная структура этой молекулы. К сожалению, на настоящий момент кристаллы ДСГ1 и 3 не получены. Однако десмоглеины относятся к семейству кадгерinov, для многих представителей которого имеются кристаллографические данные. Большим количеством работ показано, что структура «якоря» и гидрофобного кармана (ключевые позиции аминокислот), принимающих участие в формировании гомодимеров между молекулами кадгерinov и десмоглеинов, идентичны. Так, якорь у всех кадгерinov формируется 1-7 аминокислотами, а карман – бета-цепями В (I21, K23, I24), С (Y36), F (C78, A80) и петель между цепями F и G (E89, K90 и M92). Трехмерная модель первого и второго доменов ДСГЗ была сделана на основе данных кристаллографического анализа E-кадгерина человека. Для изучения локализации потенциальных В-клеточных эпитопов ДСГЗ, распознающихся аутоантителами больных ВП, требуется построение модели димера ДСГЗ, поскольку в составе десмосом эти молекулы находятся всегда в виде либо цис- либо транс-димеров. Известно, что аутоантитела больных ВП распознают не линейные, а конформационные эпитопы (Amagai et al., 1995; Ishii et al., 1997). Однако в состав этих конформационных эпитопов обязательно должны входить линейные негомологичные участки белка ДСГЗ.

В работе группы М. Amagai (Sekiguchi et al., 2001) было исследовано связывание антител из сывороток больных ЛП и ВП с химерными белками, состоящими из слитых фрагментов белков ДСГЗ и ДСГ1. Мы провели более детальный анализ этих данных и оценили возможность связывания антител с предполагаемыми нами эпитопами.

Для каждой сыворотки мы определили число возможных эпитопов (или их комбинаций). Для анализа отобрали сыворотки, распознающие только уникальный эпитоп, так как при распознавании нескольких эпитопов нельзя сказать какой из них является патогенным. В результате мы определили (таблица 2), что 53% сывороток распознают конформационный эпитоп (25-34 + 83-98), а 80% распознают линейный эпитоп 25-34, входящий в состав конформационных эпитопов 5, 6 и 7. Самый часто распознаваемый конформационный эпитоп 7 содержит в своем составе линейный эпитоп (83-98), который также входит в состав конформационного эпитопа 8. Из этих данных мы сделали вывод, что основными участками, связывание с которыми антител приводит к патогенному эффекту, являются участки (25-34) и (83-98).

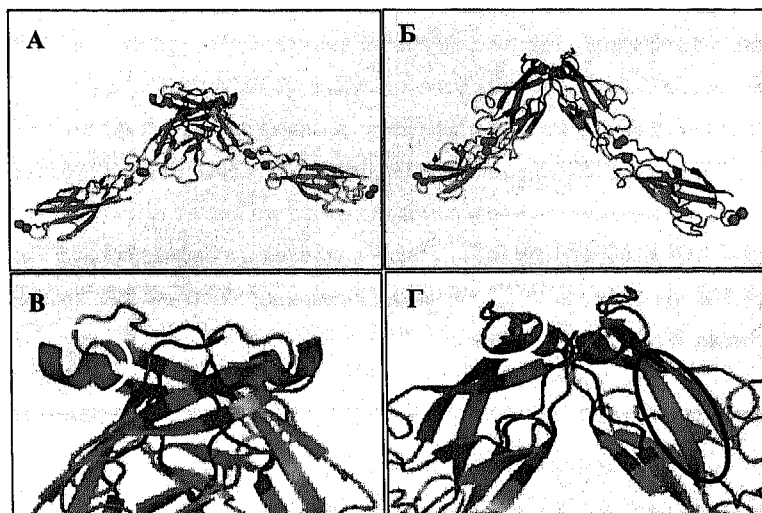
Далее мы провели картирование этих эпитопов на поверхности димера ДСГ3. Оказалось, что эпитоп (25-34) находится на вершшке димера и входит в состав альфа-спирали, а эпитоп (83-98) формирует протяженный участок, часть из которого также экспонирована на вершшке димера в петле между бета-тяжами, а второй участок занимает боковое положение и находится в самом бета-тяже (Рис.5).

**Таблица 2. Распознавание возможных конформационных эпитопов ДСГ3 сыворотками больных ВП на основе данных Sekiguchi, 2001.**

Конформационные	Эпитопы	Последовательности	N <sup>a</sup>	%
K5	№1	25-34 + <sup>b</sup>	4	27
K6	№1+№2	25-34 + 53-59	0	0
K7	№1+№4	25-34 + 83-98	8	53
K8	№3+№4	70-77 + 83-98	3	20
<b>Всего</b>			<b>15</b>	<b>100</b>

<sup>a</sup> – Каждая сыворотка распознавала только один эпитоп. Из 30 обследованных 15 (50%) сывороток распознавали один эпитоп.

<sup>b</sup> – Знаком «+» обозначен факт наличия еще одной или более аминокислоты в составе конформационного эпитопа, располагающейся вне указанных линейных эпитопов, но принимающей участие в формировании связывания с антителом. Такими аминокислотами были, например, K7 или P8; K90.



**Рис.5. Структура участка межклеточной адгезии и расположение эпитопов 25-34 (А и В) и 83-98 (Б и Г) в димере ДСГ3. Модель двух первых доменов димера ДСГ3 построена на основе трехмерной структуры димера Е-кадгерина человека. Синим цветом отмечены аминокислоты, формирующие участок связывания («якорь» и карман). Голубым цветом отмечены катионы кальция (А и Б). Эпитоп 25-34 (красный) находится в альфа-спирали (А и В). Эпитоп 83-96 (фиолетовый) имеет два разных участка: петлевой (Г, белый кружок) и бета-тяж (Г, черный овал).**

Исходя из имеющихся литературных данных по механизмам формирования димеров ДСГЗ можно предположить, что связывание аутоантител с эпитопом 25-34 (рис.5, В, выделено белым кругом) препятствует переходу цис-димера в транс-димер. В составе эпитопа 83-98 с очевидностью можно выявить два потенциальных и различающихся по свойствам эпитопа: петлевой участок на верхушке первого домена, в состав которого входят аминокислоты 83-90 (Рис.5 Г, выделено белым кругом) и протяженный участок, идущий вдоль всего домена (ак 91-98, соответственно) (Рис.5 Г, выделено черным овалом). Связывание антител с участком (83-90) аналогично по действию с участком (25-34). Связывание антител с участком (91-98), с нашей точки зрения, может нарушать формирование латерального взаимодействия, что приводит к изменению структуры упаковки ДСГЗ в десмосомах.

### *Получение и характеристика антител к ДСГЗ*

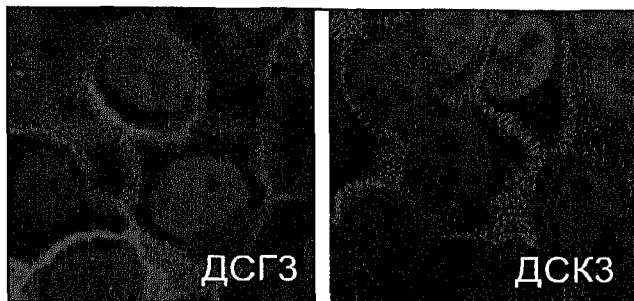
Для изучения механизмов патогенеза пузырчатки необходимо было получить антитела с известными свойствами. Мы получили антитела к Д1-2 и Д1-5 в кроликах. В результате 6-ти кратной иммунизации титры антител к Д1-2 достигали 1:100000, а к Д1-5 – примерно 1:20000, что определяли с помощью ИФА. Кроме кроличьих антител в работе также использовали коммерческие моноклональные мышинные антитела к внеклеточной части ДСГЗ человека. Для идентификации распознаваемого ими эпитопа использовали рекомбинантные белки. Показали, что эти антитела распознают эпитоп в 3-5 доменах ДСГЗ. В итоге для работы были получены и охарактеризованы антитела к Д1-2, Д3-5 и Д1-5 белка ДСГЗ, а также сыворотки больных ВП, распознающие внеклеточную часть ДСГЗ.

### *Характеристика клеточных линий кератиноцитов человека*

Для изучения патогенеза пузырчатки нам необходимы были модели эпидермиса человека. В качестве моделей мы использовали эксплантаты кожи мыши и человека, а также линии кератиноцитов человека HaCaT и A431.

Анализ литературных данных показал, что существует определенная вариабельность между сублиниями клеточных линий HaCaT и A431 по экспрессии белков адгезии. Поэтому нам необходимо было определить, какие из белков адгезии экспрессируют данные клетки. Клетки A431 не экспрессировали ДСГ1 и ДСГЗ, но

экспрессировали на низком уровне ДСК2/3. В клетках HaCaT ДСГ1 локализовался в цитоплазме и не входил в состав десмосом. И, напротив, HaCaT хорошо экспрессировали ДСГ3 и ДСК3 (рис.6), что делает данную сублинию хорошей моделью для изучения механизмов патогенеза ВП, при которой антитела к ДСГ3.



**Рис.6.** Экспрессия ДСГ3 и ДСК3 на кератиноцитах линии HaCaT. Ядра окрашены DAPI, использованы антимышьиные IgG-Alexa 488. Увеличение 3000х.

*Роль антител к различным доменам ДСГ3 в нарушении адгезии между кератиноцитами*

На настоящий момент нет однозначного мнения, каков механизм нарушения адгезии при вульгарной пузырчатке. Поскольку большинство аутоантител больных направлены к первому домену ДСГ3, то есть основания предполагать, что связывание антител с определенными участками молекулы ДСГ3 вызывает акантолиз, и такие антитела являются патогенными. Соответственно, антитела, направленные к другим участкам, могут быть как патогенными, так и нет. Для проверки патогенности антител к различным доменам ДСГ3 использовали эксплантаты кожи мышей или человека. Показали, что сыворотки больных ВП, а также кроличьи поликлональные антитела к Д1-2, но не к Д1-5, вызывают акантолиз кожи мышей (рис.7). Мышьиные моноклональные антитела к проксимальным доменам Д3-5 ДСГ3 человека оказались патогенными и также вызывали акантолиз (рис.8), характерный для ВП. Новым является демонстрация факта акантолиза, вызванного антителом не к дистальным доменам 1-2, а к проксимальным Д3-5, что означает наличие, по крайней мере, двух механизмов действия патогенных аутоантител.

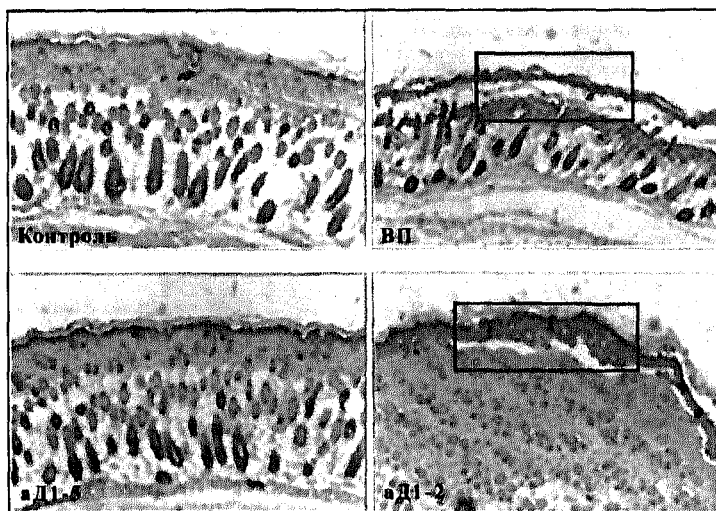


Рис. 7. Гистологические срезы кожи неонатальных мышей линии BALB/c после инкубации с антителами к D1-2, D1-5, ВП и сывороткой донора. Рамками выделены зоны акантолиза. Окрашивание гематоксилин-эозином. Увеличение 200х.

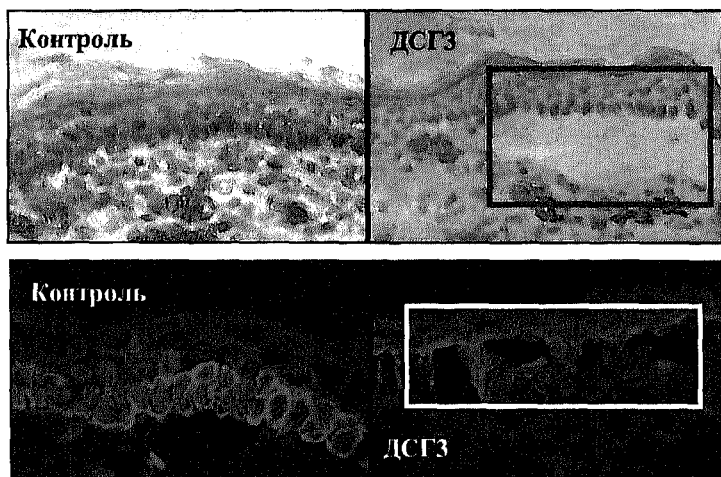


Рис.8. Индукция акантолиза антителами к D3-5 в эксплантатах неонатальной кожи человека. Верхний ряд: окраска гематоксилин-эозином, увеличение 100х. Нижний ряд: окраска антителами к цитокератинам и DAPI, увеличение 1000х. Зона акантолиза отмечена рамкой.

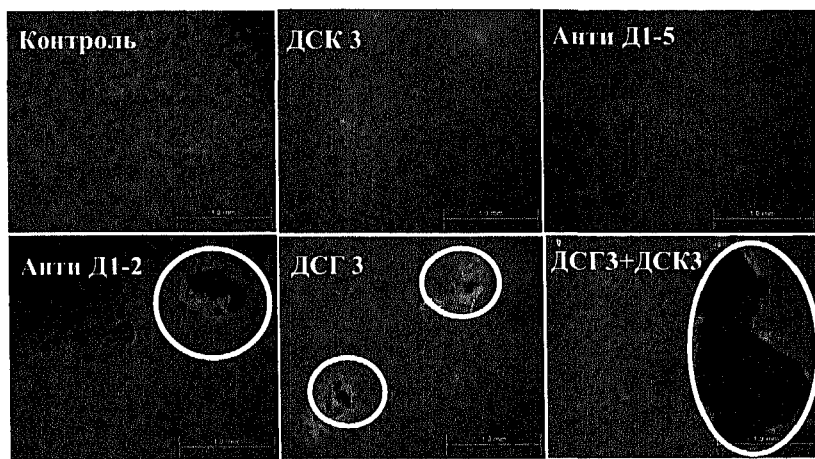
Так, антитела, распознающие D1-2, могут вмешиваться в формирование адгезивного контакта, а антитела к D3-5 – в формирование латерального взаимодействия между димерами DSG3. Полученные нами результаты также подтверждаются литературными



данными, где показано существование как патогенных, так и непатогенных антител к ДСГ3. При этом, непатогенные антитела могут быть направлены, в том числе, и к 1-2 доменам.

#### *Устойчивость линии HaCaT к действию патогенных антител*

Более детально анализ процесса акантолиза изучали на клетках HaCaT. Оказалось, что HaCaT значительно более устойчивы к действию антител к ДСГ3, чем эпителий кожи. Так, инкубация в течение 1-24ч клеток HaCaT с патогенными антителами (сыворотки больных ВП, кроличьи анти-Д1-2, моноклональные мышинные анти-ДСГ3) приводила только к снижению прочности монослоя, но не диссоциации клеток (рис.9). Увеличение концентрации антител также не оказывало влияния на адгезию.

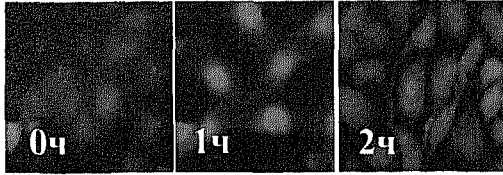


**Рис.9. Нарушение монослоя HaCaT при добавлении антител к ДСГ3.** Клетки инкубировали 14 ч в присутствии 10 мкг/мл антител. Окраска DAPI, увеличение 80х. Кругками отмечены зоны нарушения монослоя.

Отсутствие нарушения адгезии при добавлении антител к ДСГ3 говорит об ограниченном патогенном действии этих антител. Поскольку различия между культивируемыми кератиноцитами, устойчивыми к действию антител, и кератиноцитами кожи, чувствительными к их действию, не качественные, а количественные, то именно в этом различии и следует искать механизмы действия аутоантител.

*Роль кальция в нарушении адгезии*

Кальций имеет ключевое значение в формировании транс-димеров кадгеринов (Pasdar et al., 1989; Burdett et al., 2002; Klingelhofer et al., 2002). Удаление кальция из среды уже через час приводит к расслоению пласта клеток HaCaT (рис.10).

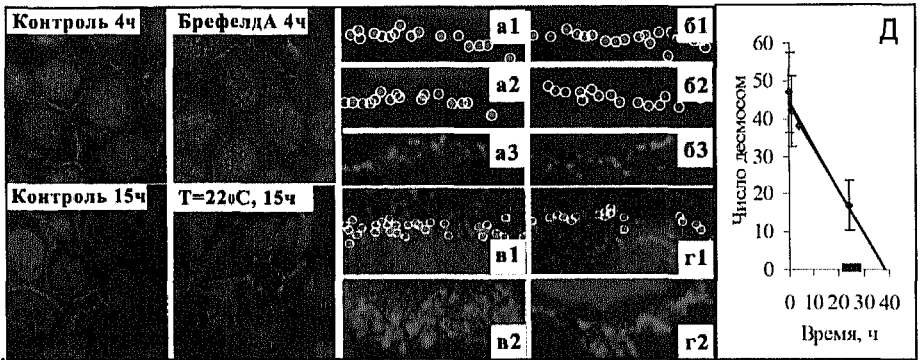


**Рис.10.** Удаление кальция приводит к расслоению монослоя HaCaT. Клетки, окрашенные CFSE, инкубировали без  $Ca^{2+}$  в течение указанного времени. Увеличение 1000х.

В эпидермисе кожи наблюдается градиент кальция с самой низкой концентрацией именно в базальном слое (Mennon et al., 1985), что предрасполагает к нарушению адгезии именно в этом слое.

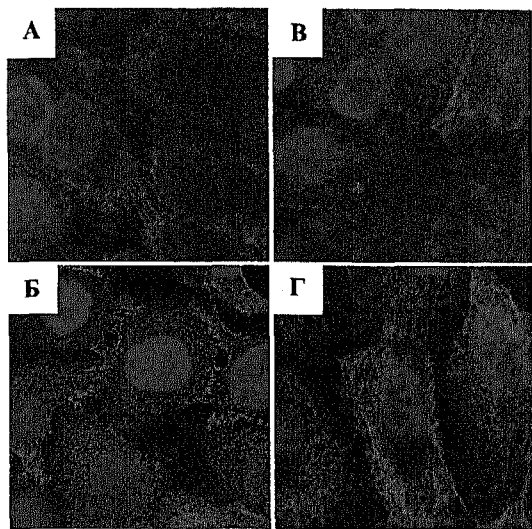
*Роль синтеза десмосом de novo в нарушении адгезии*

Вторым фактором, влияющим на количество десмосом на поверхности клеток, является образование десмосом *de novo*, поскольку известно, что происходит довольно быстрый обмен между пулом свободных и включенных в десмосому десмоглеинов. Известно, что связывание патогенных антител с ДСГ3 приводит к резкому снижению количества свободных кадгеринов (Sato, 2000; Calkins et al., 2006), что связано с интернализацией вновь синтезированных молекул с поверхности клетки.



**Рис.11.** Блокада транспорта десмосомальных кадгеринов приводит к снижению числа десмосом. Клетки HaCaT инкубировали с брeфeлдином А при 37°C 4 ч или в среде при 22 °С 15 ч. Число десмосом подсчитывали на линейных участках: а – контроль 4ч; б - брeфeлдин А 4ч; в - контроль 15 ч; г – 22 °С 15ч. Приведено несколько участков мембран равного размера. Усреднение данных а-г позволяет определить время полужизни десмосом (Д).

Оценку роли синтеза десмосом *de novo* провели при инкубации клеток с брефелдином А, ингибитором транспорта вновь синтезируемых белков на поверхность, а также инкубируя клетки при комнатной температуре, что тоже блокирует транспорт белков. В обоих случаях наблюдали снижение экспрессии десмосомальных кадгеринов и уменьшение числа десмосом на поверхности клетки (рис.11). Полученные данные показывают, что количество десмосом зависит от эффективности включения синтезированных *de novo* десмосомальных кадгеринов. При этом концентрация кальция и синтез кадгеринов *de novo* играют независимую роль и суммируются при добавлении антител больных ВП (рис.12).

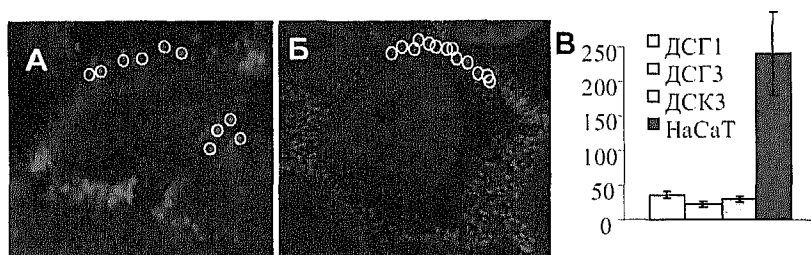


**Рис.12. Влияние концентрации  $Ca^{2+}$ , синтеза кадгеринов *de novo* и антител к ДСГ3 на адгезию между клетками.** Клетки инкубировали 15 ч при 0,3 мМ  $Ca^{2+}$  при 37°C (А и Б) или 22°C (В и Г) без (А и В) и в присутствии (Б и Г) антител больного ВП. Клетки окрашивали антителами к ДСК3 (А и Б) или к цитокератинам (В и Г). Ядра окрашены DAPI. Увеличение 2500х. Максимальная степень диссоциации клеток наблюдается при инкубации с антителами при пониженной температуре (Г)

#### *Количество десмосом на клетках эпидермиса кожи*

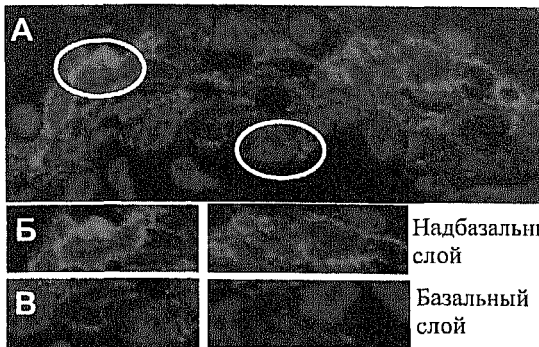
Полученные нами данные показали, что в культуре эксплантатов кожи человека или мыши добавление патогенных антител приводит к нарушению адгезии, потере рядности эпидермиса, формированию внутриэпидермальных пузырей, характерных для пузырчатки. При этом инкубация эксплантатов проводилась в присутствии 1,5 мМ кальция при 37°C в отсутствие брефелдина А, что обеспечивало полноценную адгезию между кератиноцитами и репарацию десмосом за счет вновь синтезируемых белков десмосомальных кадгеринов. С другой стороны, вызвать нарушение адгезии между клетками кератиноцитов на CaT при добавлении антител к ДСГ3 значительно сложнее. Поскольку расслоение монослоя на CaT достигалось только при снижении

концентрации кальция, что вело к снижению числа десмосом на поверхности клеток, то мы предположили, что на кератиноцитах в эпидермисе должно быть меньше десмосом, чем на культивируемых *in vitro* клетках HaCaT. Для анализа числа десмосом на кератиноцитах эпидермиса получали криосрезы нормальной неонатальной кожи человека и инкубировали их с антителами к ДСГ1, ДСГ3 и ДСК3 в течение ночи при +4°C. Число десмосом оценивали аналогично данным, приведенным на рис.11. С помощью данного метода удастся провести полуколичественный подсчет, который показал, что на клетках нижнего, прилегающего к базальному слою кератиноцитов, на поперечном оптическом срезе клетки находится примерно 25-40 десмосом (рис.13). Данные хорошо согласуются при определении числа десмосом с помощью антител к разным десмосомальным кадгеринам. На поверхности клеток HaCaT примерно в 5 раз больше десмосом (170-240) на том же поперечном слое, что, по-видимому, и объясняет их устойчивость к действию антител к ДСГ3. Количество десмосом на клетках HaCaT зависит от времени инкубирования.



**Рис.13.** Плотность десмосом на кератиноцитах кожи (А) и клетках линии HaCaT (Б). В. По оси ординат приведено число десмосом для поперечного среза одной клетки. Для клеток эпидермиса число десмосом определяли антителами к ДСГ1, 3 и ДСК3; для клеток HaCaT – антителами к ДСК3.

Поскольку известно, что в эпидермисе кожи существует градиент концентрации кальция, то возможен также и градиент плотности десмосом в различных слоях. Анализ числа десмосом на клетках различных слоев эпидермиса кожи показал, что, действительно, на клетках супрабазального слоя экспрессируется меньше десмосом, чем на клетках вышележащего слоя (рис.14).

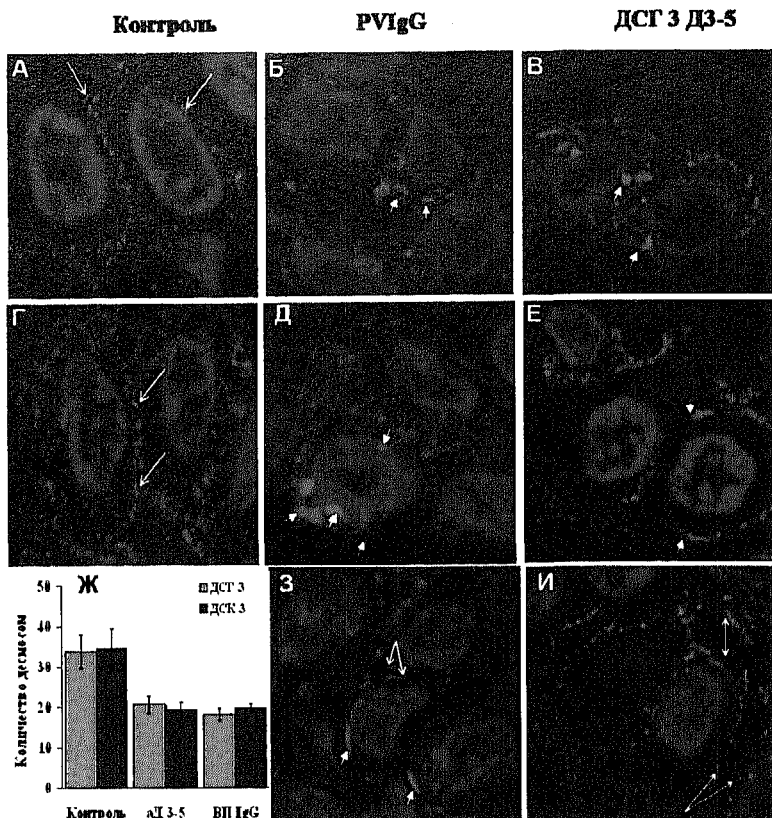


**Рис.14. Экспрессия десмосомальных кадгеринов на клетках эпидермиса кожи человека.** А. Кружками показаны участки разных слоев. Увеличение 2000х. Б и В-участки надбазального и базального слоев. Увеличение 4000х. Клетки окрашены антителами к ДСГ3, ядра – DAPI.

Известно, что аутоантитела при ВП нарушают адгезию именно в слое, находящемся непосредственно над базальным слоем, то есть именно там, где концентрация десмосом, по нашим данным, самая низкая. Соответственно, можно предположить, что именно это и объясняет, почему здесь нарушается адгезия.

*Патогенные антитела к десмоглеину 3 снижают число десмосом в супрабазальном слое кератиноцитов кожи*

Связывание патогенных аутоантител с ДСГ3 приводит к интернализации не включенных в десмосому белковых молекул. Длительная инкубация (более 24 часов) образцов кожи с патогенными антителами приводит к потере межклеточной адгезии и акантолизу. При инкубации с антителами образование новых десмосом на поверхности клетки затруднено из-за интернализации свободных молекул кадгеринов, в то же время поведение оставшихся десмосом является слабо изученным. С помощью подхода, описанного выше, мы оценили количество десмосом на поперечном срезе кератиноцитов кожи, инкубированной с антителами к рецептору TNF  $\alpha$ , сывороткой больных ВП и моноклональными антителами к Д3-5 ДСГ3 в течение двух суток. Мы показали, что количество десмосом видимых на поперечном срезе кератиноцитов надбазального слоя достоверно уменьшается при инкубации с патогенными антителами (Рис. 15, Ж). Уменьшение числа десмосом выявлено при окрашивании антителами как к ДСГ3, так и к ДСК3. При этом наблюдаются морфологические изменения самих десмосом – они сливаются в большие «супердесмосомы» (Рис.15, Б, В, Д, Е, стрелки). В образцах инкубированных с антителами к ДСГ3 и сывороткой ВП, наблюдается расслоение десмосом на две полудесмосомы (Рис.15 З, И).



**Рис. 15.** Уменьшение числа десмосом в кератиноцитах надбазального слоя кожи при инкубации с патогенными антителами. А, Б, В, З – вторые антитела к ДСК3; Г, Д, Е, И – вторые антитела к ДСГ3. Следует отметить различия в размерах и количестве десмосом на кератиноцитах из контрольных образцов (А, Г, открытые стрелки) и инкубированных с патогенными антителами (Б, В, Д, Е – закрытые стрелки). Ж – снижение количества десмосом при инкубации с патогенными антителами. З, И – инкубация с патогенными антителами приводит к расслоению десмосом на две полудесмосомы, остающихся в местах контакта соседних клеток (двойные стрелки).

Возможно также, что происходит полная интерпализация десмосом без предварительной разборки десмосомального контакта (Рис. 15 Д, большие десмосомы и их околядерная локализация, отмечено стрелками). В таком случае патогенное действие антител связано не с прямым нарушением десмосомального контакта за счет стерического фактора, а по причине блокирования патогенными аутоантителами процесса сборки десмосом *de novo*.

## **Выводы:**

1. В бакуловирусной системе получены и охарактеризованы 4 фрагмента, соответствующие доменам 1, 2, 1-2 и 1-5 внеклеточной части ДСГЗ человека.
2. С помощью рекомбинантных белков показано, что аутоантитела больных ВП преимущественно распознают дистальные домены ДСГЗ.
3. Идентифицировано два потенциальных патогенных эпитопа ДСГЗ. Вероятно, что антитела к эпитопу (25-34) нарушают переход десмоглеина 3 из цис- в транс-димеры, а к эпитопу (83-98) – латеральные взаимодействия между десмоглеинами.
4. Получены и охарактеризованы антитела к Д1-2, Д1-5, Д3-5 ДСГЗ и показано, что патогенными могут быть антитела как к дистальным, так и проксимальным доменам ДСГЗ. Показано, что антитела к ДСГЗ могут быть также и непатогенными.
5. Показано, что патогенные антитела к ДСГЗ вызывают акантолиз кератиноцитов в эксплантатах кожи, но не нарушают монослой клеток линии кератиноцитов человека HaCaT, что прямо связано с числом десмосом на поверхности клеток.
6. Показано, что патогенные антитела к ДСГЗ снижают количество десмосом на поверхности кератиноцитов кожи с одновременным увеличением их размеров, что приводит к расслоению десмосом и потере межклеточной адгезии.

## **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

### **Статьи**

1. Матушевская Е.В., Коцарева О.Д., Багаева Л.В., Дзучева И.Р., Лысенко А.А. Блокада акантолиза эпидермиса при вульгарной пузырчатке протективными антителами. Вестник дерматологии и венерологии, 2003, т.4, с.4-7.
2. Лысенко А.А., Коцарева О.Д., Мушенкова Н.В., Дзучева И.Р., Матушевская Е.В., Свищевская Е.В. Создание модели пузырчатки на мышах. Медицинская иммунология. 2004, т. 6, 3-5, с.238.
3. Свищевская Е.В., Лысенко А.А., Коцарева О.Д., Матушевская Е.В. Роль эндотелиальных клеток в патогенезе пузырчатки: экспериментальная модель. Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии, 2006, т.1, с.10-17.
4. Лысенко А.А., Коцарева О.Д., Матушевская Е.В., Свищевская Е.В. Роль эндотелиального барьера в патогенезе pemphigus vulgaris, Медицинская иммунология. 2006, т.8, №2-3, с.154.

5. Лысенко А.А., Свирщевская Е.В. Моноклональные антитела к 3-5 доменам десмоглеина 3 человека вызывают акантолиз *in vitro*. Российский иммунологический журнал. 2008, т.2, 2-3, с.235.

#### Тезисы докладов на конференциях

1. Kotsareva O.D, Viskova N.J., Svirshchevskaya E.V., Matushevskaya E.V, Dzutseva I.R, Lysenko A.A. High affinity antibodies to proximal domains of extracellular desmoglein 3 protect from acantolysis induced by pemphigus autoantibodies. Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, 2003. 7-11 June, Paris, Abs. p.148.
2. Lysenko A.A., Kotsareva O.D., Svirshchevskaya E.V. Seventh John Humphrey advanced summer programme in immunology "The interface between immunology and medicine", 2005, September 5-9, г. Москва, Тезисы "Activation of endothelium plays a crucial role in pemphigus", p. 29.
3. Лысенко А. А., Дементьева Д.В., Косинский Ю.А., Некрасов А.Н., Свирщевская Е.В. Международный междисциплинарный симпозиум «От экспериментальной биологии к превентивной и интегративной медицине», 2008, 19-30 сентября, г.Судак, Крым, Украина. Труды Симпозиума, «Идентификация патогенных конформационных эпитопов десмоглеина 3 человека с помощью методов молекулярного моделирования», стр.88.



---

Заказ № 42/12/2008 Подписано в печать 29.12.2008 Тираж 100 экз. Уол. п.л. 1.5

---



ООО "Цифровик", тел. (495) 649-83-30; (495) 778-22-20  
[www.cfr.ru](http://www.cfr.ru) ; e-mail: [info@cfr.ru](mailto:info@cfr.ru)