

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

Институт по Микробиология „Стефан Ангелов”

Илиян Константинов Манойлов

***Специфична терапия на автоимунен диабет
при миши и хуманизирани модели***

АВТОРЕФЕРАТ

на

ДИСЕРТАЦИЯ

За присъждане на образователната и научна степен

„ДОКТОР”

Професионално направление: **4.3** "Биологически науки",

научна специалност "Имунология" **01.06.23**

Научен ръководител:
доц. Андрей Чорбанов, дб

**София
2019г.**

Този труд беше осъществен с помощта на проект НФДП53/27.04.16, предоставен от Програма за подпомагане на младите учени в БАН и на проект ДН03/11/2016 предоставен от Фонд Научни Изследвания.

Използвани съкращения:

APC, antigen presenting cell - АПК, антиген представяща клетка

BCR, B-cell receptor - Б-клетъчен рецептор

BSA, Bovine serum albumin - Говежди серумен албумин

CD, cluster of differentiation - Клъстер на диференциация

CR, complement receptor - Рецептор за комплемент

CRP, C-reactive protein - С-реактивен белтък

CTL, Cytotoxic T lymphocyte - Цитотоксичен Т-лимфоцит

DCs, Dendritic cells - Дендритни клетки

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay- Ензимно-свързан имуносорбентен тест

ELISpot, Enzyme-Linked ImmunoSpot - Ензимно-свързан имуносорбентен точков анализ

FcγR, Fc gamma Receptor - Fc-гама рецептор

FITC, Fluorescein isothiocyanate - Флуоресцин изотиоцианат

GABA, gamma-Aminobutyric acid - Гама-аминомаслена киселина

GAD, Glutamate decarboxylase - Декарбоксилаза на глутаминовата киселина

HLA, Human leukocyte antigen - Човешки левкоцитен антиген

IFN, Interferon - Интерферон

Ig, Immunoglobulin - Имуноглобулин

IGF, insulin-like growth factor - Инсулиноподобен растежен фактор

IL, interleukine - Интерлевкин

ITAM, Immunoreceptor tyrosine-based activation motif –

Имунорецепторен тирозин-базиран активационен мотив

ITIM, Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif -

Имунорецепторен тирозин-базиран инхибиторен мотив

IVIg, Intravenous Immunoglobulin - Интравенозен имуноглобулин

LADA, Latent Autoimmune Diabetes in Adults - Латентен автоимунен диабет при възрастни

LPS, Lipopolysaccharide - Липополизахарид

MHC, Major Histocompatibility Complex - Главен комплекс на тъканната съвместимост

MS, Multiple Sclerosis - МС, множествена склероза

NK, natural killer cells - Естествени клетки убийци

NOD, Non-obese diabetic mice - NOD мишки

PBMC, peripheral blood mononuclear cell - Периферни мононуклеарни клетки

PBS, Phosphate-buffered Saline - Фосфатно-буфериран разтвор

PE, Phycoerythrin - Фикоеритрин

RA, Rheumatoid arthritis- РА, ревматоиден артрит

RPMI, Roswell Park Memorial Institute - Хранителна среда RPMI

SCID, Severe Combined Immunodeficiency - SCID мишки

SLE, Systemic Lupus Erythematosus - СЛЕ, системен лупус еритематозус

STZ, Streptozotocin - Стрептозотоцин

T1D, Type 1 diabetes - Диабет тип 1

TH, Hashimoto's thyroiditis - ТХ, тиреоидит на Хашимото

TNF, Tumor necrosis factor - Тумор-некротизиращ фактор

I. Увод

Имунната система представлява сложна структура от органи, тъкани и клетки, обединени около една обща функция – защита на организма от патогенни организми и вредни субстанции. Ефективността на имунната система се дължи, до голяма степен, на способността ѝ да разграничава „свои“ от „чужди“ за организма структури. В случаите, в които тя погрешно разпознае собствени молекули като потенциално опасни, имунната система се активира срещу тях и възникват автоимунни заболявания като системен лупус еритематозус, множествена склероза, автоимунен диабет и други.

Патогенезата на автоимунния диабет е хетерогенна, като в основата ѝ е атаката на имунната система върху панкреатичните бета-клетки, хормона инсулин и рецептора за него. Множество клинични и експериментални проучвания доказват имунно-медирано разрушаване на бета-клетките в пациенти с генетична предразположеност. Счита се, че при излагане на различни фактори на средата като храна, вируси и химикали, тези фактори могат да активират имунната система и да я насочат към собствените структури, отговорни за регулацията на кръвната захар в организма. Резултат от тази атака са увреждания, които водят до хипергликемия, метаболитни нарушения и генериране на автоантитела, специфични срещу широк набор автоантигени.

Клетки, които участват в придобития имунитет са в основата на разрушаването на панкреатичните бета-клетки. Автореактивни CD8⁺ Т-лимфоцити ги атакуват и ги увреждат. Автоагресивни CD4⁺ Т-лимфоцити взаимодействат с Б-лимфоцити, които представят собствени пептиди, и така стимулират пролиферацията им и диференциация до антитяло-продуциращи плазмоцити. Макар, че авторитеактивните Т-лимфоцити са сочени за клетките, причиняващи основните поражения при автоимунния диабет, за учените авторитеактивните Б-лимфоцити имат все по-голяма роля в активирането на Т-клетките и в патогенезата на това заболяване.

Голям напредък в изследванията на автоимунния диабет беше определянето на автоантигените в хода на заболяването.

Инсулин, инсулинови рецептори и мембранно свързани молекули са считани за основните мишени в хода на автоимунната атака. За основен автоантиген е посочен ензимът декарбоксилаза на глутаминовата киселина 65 (GAD 65). Това е 65kDa мембранно-свързана молекула, която превръща аминокиселината глутамат в гама аминокиселина (GABA). Антитела, насочени срещу GAD65, са с основна роля при развитието на болестта. Смята се, че активирани Б-лимфоцити могат да нарушат толеранса на Т-лимфоцитите и да повлияят активността на Т-регулаторните клетки.

Целта при лечение на автоимунен диабет е да бъде ограничено автоимунното разрушаване на панкреатични бета-клетки. Съвременните терапии, при които са използвани Циклоспорин А, Теплизумап и Ритуксимаб са неспецифични и имат множество странични ефекти. Ефикасен, но краткотраен и скъп подход е трансплантирането на острови на Лангерханс. Този кратък ефект е следствие от активиране на придобития имунитет или подновяване на автоимунните симптоми. Важността на Б-клетките в патогенезата на автоимунният диабет е подчертана в изследвания, които използват моноклоналното анти тяло Ритуксимаб. То разпознава молекулата CD20 на повърхността на Б-клетките и води до тяхното отстраняване.

Активирането и деактивирането на Б-лимфоцитите е свързано с експресиране на множество рецептори по повърхността им – част от тях активиращи, друга – блокиращи. Човешкият рецептор за комплемент 1 (CR1, CD35) потиска активацията и пролиферацията в човешки Б-лимфоцити, при едновременно омрежване с Б-клетъчния рецептор (BCR). При мишки, рецепторът за Fc-фрагмента на тежката верига на IgG молекулите (FcgammaR2b) изпълнява подобна (блокираща) функция.

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проследи ефекта от използването на молекули, продукт на протеиново инженерство, *in vitro* и в експериментални хуманизирани и миши модели на автоимунен диабет. Тези молекули могат едновременно да ангажират човешки BCR и CR1 (при хуманизиран модел) или миши BCR и FcgammaR2b (при миши модел). Химерните молекули ще бъдат насочени към

автоимунни Б-лимфоцити, като целта е да бъде възстановен имунният толеранс към GAD65 в експериментални моделни системи на автоимунен диабет. Получените експериментални резултати разкриват потенциала на химерните молекули при терапия на автоимунен диабет. Представеният метод на конструиране на терапевтични средства може да бъде използван за създаването на подобни молекули при други заболявания, свързани с неправилна работа на имунната система. В хода на изследванията на хуманизирания и мишия модел бяха разкрити механизми за протичането на заболяването и бяха изпитани нови методи за терапия, в система, доближаваща се в голяма степен до човешката.

II. Цел и задачи

Цел: Да бъде проследен ефектът от приложението на химерни антитела в модели на автоимунен диабет тип 1.

Задачи I:

1. Да бъдат определени потенциални епитопи от GAD65 посредством сървър за *in silico* предсказване на епитопни последователности.
2. Да бъдат генерирани протеиново-инженерни химерни молекули – GAD65 chimera1, GAD65 chimera 2 и контролна химера.
3. Да бъде изследвана способността им да разпознават човешки CR1 в клетки изолирани от пациенти и здрави донори.
4. Да бъде установен ефектът на химерните антитела върху пролиферацията и диференциацията на PBMC *in vitro*.
5. Да бъде установен ефектът на химерните молекули върху нивата на апоптоза в PBMC от диабетни пациенти и здрави донори *in vitro*.
6. Да бъде адаптиран хуманизиран модел на диабет тип 1 в NSG мишки чрез трансфер на PBMC от пациенти и от здрави донори.
7. Да бъде установен ефектът от приложението на химерните молекули *in vivo* върху хуманизирани животни.
8. Да бъдат охарактеризирани хистологично промените в органите на хуманизираните NSG мишки, третирани с химерните антитела и да бъдат сравнени с тези от контролните групи.

Задачи II:

9. Да бъдат генерирани протеиново-инженерни химерни молекули – mouse GAD65 chimera 1и mouse GAD65 chimera 2.
10. Да бъде генериран миши модел на диабет тип 1, посредством STZ.
11. Да бъде изследвана способността им да разпознават миши FcγRIIB в клетки изолирани от мишки с предизвикан диабет тип 1.
12. Да бъде установен ефектът на химерните антитела върху диференциацията на спленоцити изолирани от диабетни животни *in vitro*.
13. Да бъде установен ефектът на химерните молекули върху нивата на апоптоза в спленоцити от диабетни животни *in vitro*.
14. Да бъде установен ефектът от приложението на химерните молекули *in vivo* върху хуманизирани животни.
15. Да бъдат охарактеризирани хистологично промените в органите на хуманизираните NSG мишки, третирани с химерните антитела и да бъдат сравнени с тези от контролните групи.

III. Материали и методи. Част 1 – Хуманизирана моделна система

1. Моноклонални антитела

Мишата хибридома 3D9 (предоставена от Рон Тейлър, САЩ), която продуцира IgG1 антитела, специфични към човешки CR1 (CD35) беше адаптирана за растеж в безсерумна среда RPMI 1640 (Gibco, Гайтсбург, САЩ). Антителата от супернатантата бяха изолирани чрез преципитация с 50% амониев сулфат. Полученият преципитат беше подложен на трикратна диализа срещу PBS (два пъти срещу 50 пъти по-голям обем от обема на пробата за 12 часа на 4°C и един път в същото обемно съотношение, но за 2 часа на стайна температура). И трите диализи бяха проведени при разбъркване. Пречистеното антитяло беше концентрирано чрез утлафилтрация през филтър, който да пропусне всички молекули до 10 kDa. Фракциите бяха допълнително пречистени с помощта на Protein G хроматографска колона и филтрация през филтър с големина на порите 0,45µm. Абсорбцията на получения продукт беше измерена на спектрофотометър при дължина на вълната 280 nm. Концентрацията на антитялото беше определена посредством стандартна права за IgG. Чистотата на продукта беше потвърдена с 10% SDS-PAGE при нередуциращи условия с разтвор за оцветяване на белтъци (PageBlue™ Protein Staining Solution, Thermo Fischer Scientific, Уолтъм, САЩ) и също чрез Western Blotting, като беше използвано анти-мише IgG антитяло, конюгирано с алкална фосфатаза (Pharmingen BD, Сан Диего, САЩ). Получените и пречистени антитела бяха използвани за конструирането на химерни молекули и за конюгиране с FITC.

При свързването с FITC (Fluorescein isothiocyanate, Thermo Fischer Scientific, Уолтъм, САЩ), антитяло с концентрация 2-4 mg/ml беше диализирано срещу 0.1M Na₂CO₃ буфер с pH=9. Към пречистеното и диализирано антитяло беше добавен FITC, разтворен в DMSO и разтворът беше инкуиран 8 часа при 4 °C на тъмно. За да бъде стабилизираният продуктът, към него беше добавен NH₄Cl в крайна концентрация 50 mM,

последвано от инкубация с продължителност 2 часа при 4 °C на тъмно. Полученият разтвор беше пречистен от излишното количество несвързан FITC посредством size-exclusion хроматографска колона с Sephadex G50. След пречистването на пробата беше проведено спектрофотометрично измерване при 280 nm (за общ белтък) и при 495 nm (за FITC). Отношението между получените стойности при двете дължини на вълната – 495/280 трябва да бъде между 0.3 и 1.0, като това е белег за добро свързване.

Антитялото конюгирано с FITC беше използвано при последващите анализи с проточен цитометър. При тях бяха използвани още анти-човешки CD19-phycoerythrin (PE), CD19-eFluor450, CD3-PE/cyanin 7 (Cy7), CD3-PE/cyanin 5 (Cy5), CD4-Allophycocyanin (APC), CD8-PE и CD45-Fluorescein isothiocyanate (FITC) антитела (eBioscience, Франкфурт, Германия). За изотипни контроли бяха използвани IgG1 kappa-PE, IgG1 kappa-eFluor 450, IgG1 kappa-PE/Cy7, IgG1 kappa-PE/Cy5, IgG1 kappa-APC и IgG1 kappa-FITC (eBioscience).

2. Определяне на потенциални епитопи от GAD65 посредством EpiDOCK

За да бъдат определени потенциални епитопи от GAD65 беше използван EpiDOCK- сървър за *in silico* предсказване на участъци, към които да се свърже МНС II молекулата. Софтуерът използва количествени матрици, с които анализира резултатите от свързването на пептиди към HLA II комплексите. След въвеждане на аминокиселинната последователност на белтъка, сървърът я превръща в множество застъпващи се намерени пептиди. Всеки от намерените е оценяван от EpiDOCK на база свързване към 23те най-често срещани МНС II белтъци - 12 HLA-DR, 6 HLA-DQ и 5 HLA-DP. Програмата определя 90% от сигурните епитопи и 76% от епитопи, които няма да се свържат. Общата точност на софтуера е 83%. (Atanasova, Patronov et al. 2013) За целите на дисертацията бяха проверени най-често свързваните с диабет алели: DQ8 (DQA1*03:01/DQB1*03:02), DRB1*04:01 и

DRB1*04:05, като беше определен праг от 0.1 за DQ8, 0.3 за DRB1*04:01 и DRB1*04:05.

3. Пептиди

В експериментите бяха използвани следните пептидни последователности от GAD65 - YVVKSFDRSTKVIDFHYPNE и LPRLIAFTSEHSHFSLKKGGA, които включват аминокиселини от 121 до 140 и от 270 до 289, включително. Беше използван и контролен пептид, който съдържа аминокиселини в различна последователност, която не представлява епитоп. За да бъдат конструирани химерните молекули от фирма Caslo Laboratory, Дания, бяха поръчани следните синтетични пептиди: Ac-YVVKSFDRSTKVIDFHYPNE-Ahx-K-CONH₂, Ac-LPRLIAFTSEHSHFSLKKGGA-Ahx-K-CONH₂, които да послужат за активните химерни молекули и Ac-DEACLQCGSEDHQAVQNLLS-Ahx-K-NH₂, който да послужи за контролната химера. Пептидите бяха с чистота $\geq$ на 96%, постигната посредством пречистване на HPLC.

4. Конструирание на химерни молекули

С помощта на получените анти-човешки CR1 антитела и синтезираните пептиди бяха конструирани общо 3 химерни молекули: две химери, които съдържат пептидните епитопи, прогнозирани от EpiDOCK софтуерът и една химера, която съдържа контролния пептид. И трите химери съдържат анти-CR1 моноклонално антитяло, получено от действието на хибридомите.

Свързването на антителата към различните пептиди беше осъществено с използването на класическа 1-ethyl-3(3'-dimethylaminopropyl) carbodiimide·HCl (EDC Fluka AG, Buchs SG, Switzerland) методика (Bauminger and Wilchek 1980). Свързването на пептидите към мишето IgG1 антитяло се извършва посредством линкерен участък, конюгиран към C-края на пептида – Ahx-KNH₂. Между аминокиселинната група от лизина на линкера и активирани карбоксилни групи по повърхността на антитялото се образува ковалентна химична връзка.

Посредством линкерът пептидът придобива нормална пространствена структура и може да бъде разпознат от BCR, което е изключително важно за правилното функциониране на химерните молекули.

Пептидът беше добавен към анти тялото в 20-кратен моларен излишък. Химичната реакция се активира след добавянето на карбодиимид в 60 кратен моларен излишък спрямо анти тялото. Самата реакция протича 12 часа на 4 °C при постоянно разбъркване на магнитна бъркалка. След изтичането на 12те часа, разтворът беше диализиран двукратно срещу PBS и беше концентриран чрез ултрафилтрация през 10 kDa филтър. Концентрираната проба беше филтрирана през филтър с големина на порите 0,45µm, след което концентрацията беше определена чрез спектрофотометрично измерване на абсорбцията при 280 nm. Крайният продукт беше стерилизиран чрез филтрация през 0,22 µm филтър.

Тази техника беше приложена при конструирането на всичките химери в човешкия модел на диабет тип 1 - GAD65 chimera 1, GAD65 chimera 2 (съдържащи съответно пептиди p121-140 и p270-289) и контролна химера (съдържаща контролния пептид).

Масспектрометричен анализ на химерни молекули, конструирани със същата техника доказва, че между 14 и 16 пептида се свързват към едно анти тяло в рамките на една химерна IgG молекула. (Tchorbanov, Voynova et al. 2007)

5. Пациенти и здрави донори

За изпитване на потенциала на химерите в човешката моделна система бяха подбрани 6 (n=6) пациента с диабет тип 1 (като отношението между мъжете и жените беше 5:1) и от тяхна периферна кръв беше изолирана лимфоцитната фракция. Освен клетки, от пациентите беше изолиран и серум за допълнителни *in vitro* тестове. Пациентите бяха на възраст между 20 и 32 години. Критерият за включване в изследването беше наличие в серума на антитела срещу GAD65 и повишена кръвна захар

≥200 mg/dl (11.1 mmol/l). Контролната група беше представена от 6 здрави недиабетни донора при сходно полово съотношение и възраст. Експериментите бяха проведени в съгласие с локалната етична комисия и с информираното съгласие на пациентите и донорите.

6. Лабораторни животни

Женски 8-седмични NOD-scid IL2gnull мишки бяха закупени от The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Животните бяха отглеждани при SPF (specific-pathogen-free) условия в специално изграден вивариум от бариерен тип с климатизиран стерилен въздух. Експерименталната работа с животните и всички манипулации по настоящата работа бяха одобрени от Комисията за етична работа с лабораторни животни към Институт по Микробиология в съответствие с националните норми и законодателството на Република България (EU Directive 2010/63/EU).

7. Получаване на серуми от пациенти, здрави донори и от лабораторни мишки

При изолирането на кръвта от пациентите и здравите донори, фракция от нея беше отделена и прехвърлена в епруветка за изолиране на серум (Vacutainer, BD), където кръвта беше оставена да престои 30 мин. на 4 °C. Серумите бяха получени след еднократно центрофугиране при 1500 об./мин. на 4 °C за 10 мин. и бяха съхранявани при –70 °C.

Опитните животни бяха кръпопускани на всеки 7 дни, като беше използван ретро-орбиталният венозен синус. Серумите бяха получени след двукратно центрофугиране при 1500 об./мин. на 4 °C за 10 мин., след което бяха съхранявани при –70 °C.

8. ELISA за доказване на GAD65 пептидите в състава на химерните молекули

Способността на антитела от серуми на пациенти с диабет и здрави донори да разпознават епитопния компонент на химерите беше проверена посредством ELISA тест. 96-ямкови

плаки (Maxisorp, Nunc, Роскилде, Дания) бяха натоварени с GAD65 химера 1, GAD65 химера 2, или контролна химера (0.5 mg/ml в PBS) и инкубирани в продължение на една нощ при температура 4 °C. На следващия ден плаките бяха промити трикратно с PBS и блокирани с 0.1% желатин за 2 часа на стайна температура, след което бяха промити още 2 пъти с PBS. Предварително разредени (1:100 в T-PBS) серуми от пациенти с диабет тип 1 и здрави донори бяха прибавени към натоварените ямки и инкубирани за 1 час на стайна температура. Свързването на човешки анти-GAD65 IgG антитела към имобилизираните химерни молекули беше определено чрез последваща инкубация за 1 час с анти-човешко IgG анти тяло конюгирано с алкална фосфатаза (Sigma-Aldrich). След добавяне на субстрата - pNPP (para-Nitrophenylphosphate) (Sigma-Aldrich), и изчакване 20 минути за развитие на цветната реакция, оптичната плътност беше определена спектрофотометрично при 405 nm.

9. Изолране на периферни мононуклеарни клетки (PBMC) от човешка кръв

PBMC бяха изолирани посредством стандартен протокол за разделяне с центрофугиране в Pancoll 1.077 g/ml (PAN Biotech, Айденбах, Бавария, Германия) на хепаринизирана кръв от пациентите и здравите донори. След процедурата клетките бяха промити 2 пъти в среда RPMI-1640 с 10% FCS. Клетките бяха преброени на броячна камера на Бюркер, а жизнеспособността им беше оценена посредством оцветяване с трипаново синьо. След последното центрофугиране клетките бяха ресуспендирани в определен обем, за да достигнат необходимата концентрация за всеки отделен експеримент.

10. Анализ на химерите с проточен цитометър

PBMC от пациенти с диабет тип 1 или здрави донори (1×10^6 клетки/ml) бяха промити с FACS буфер (PBS, който съдържа 2.5% фетален телешки серум (FCS) и 0.05% натриев азид) и подложени на анализ за компетентно свързване.

Клетките бяха инкубирани с конструираните химерни молекули ($1 \mu\text{g}/10^6$ клетки) за 30 мин. при 4°C . Контролните епруветки бяха инкубирани с неконюгирано анти-CD35 моноклонално анти тяло или само с PBS. На следващата стъпка, клетките бяха промити 2 пъти и инкубирани с анти тяло специфично за CD35 (клон 3D9), конюгирано с FITC и комбинирано с анти-човешки CD19-PE или анти-човешки CD3-PE/Cy5 антитела за 30 мин. при 4°C . След края на инкубирането 10 000 клетки от всяка проба бяха анализирани с проточен цитометър BD LSR II, който използва софтуер Diva 6.1.1. (BD Biosciences, Маунтин Вю, САЩ)

11. Измерване на нивата на апоптоза

PBMC от нетретирани пациенти с автоимунен диабет и здрави донори бяха култивирани в 96 ямкова плака за клетъчно култивиране за 3 дни (2×10^6 клетки/ml) в среда RPMI 1640 с 10% FCS в присъствието на различни концентрации от химерните молекули (40, 100, 250 и 625 ng/ml) при температура от 37°C и наситеност на въздушната среда с 5% CO_2 . След края на култивирането клетките бяха промити трикратно с леденостуден PBS (+ 1% FCS + NaN_3) и бяха белязани с e-Fluor 450 конюгирани анти-CD19 или PE/Cy7 конюгирани анти-CD3 антитела за 15 мин./ 4°C /на тъмно. След двукратно промиване с леденостуден PBS (+ 1% FCS + NaN_3), клетките бяха белязани с помощта на Annexin V-FITC apoptosis detection Kit (eBioscience), според инструкциите предоставени от производителя. Накратко, клетките бяха промити еднократно с 1x Binding buffer (част от кита) и бяха ресуспендирани в $100 \mu\text{l}$ от същия разтвор. Клетките бяха белязани с добавяне на AnnexinV-FITC и пропидиев йодид (PI), вортексирани и инкубирани за 15 мин./стайна температура/ на тъмно. След това към всяка проба бяха добавени $300 \mu\text{l}$ 1x Binding buffer. Жизнеспособността на изследваните специфично CD19+ В клетки или CD3+ Т клетки беше измерена на проточен цитометър.

12. МТТ анализ за потискане на клетъчната пролиферация

PBMC от нетретиранни пациенти с автоимунен диабет и здрави донори бяха култивирани в 96-ямкова плака за клетъчно култивиране за 3 дни (2×10^6 клетки/ml) в среда RPMI 1640 с 10% FCS в присъствието на различни концентрации от химерните молекули, контролната химера и пречистеното анти-CD35 анти тяло (40, 100, 250 и 625 ng/ml) и при температура от 37 °C и наситеност на въздушната среда с 5% CO₂. За контроли на опитните ямки бяха използвани: 10 µg комбинация от двата пептида/ на ямка (5µg p121-140 и 5µg p270-289), комбинация от анти-CD3/CD28 античовешки антитела (2.5 µg/ml) или само клетъчна среда. След изтичането на инкубационния период, клетките бяха инкубирани 4 часа в присъствието на MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide], след което средата им беше отдекантирана и беше добавено DMSO към всяка проба. Абсорбцията на разтворените формазанови кристали беше измерена при дължина на вълната 590 nm, като фоновото оцветяване беше определено при 620 nm.

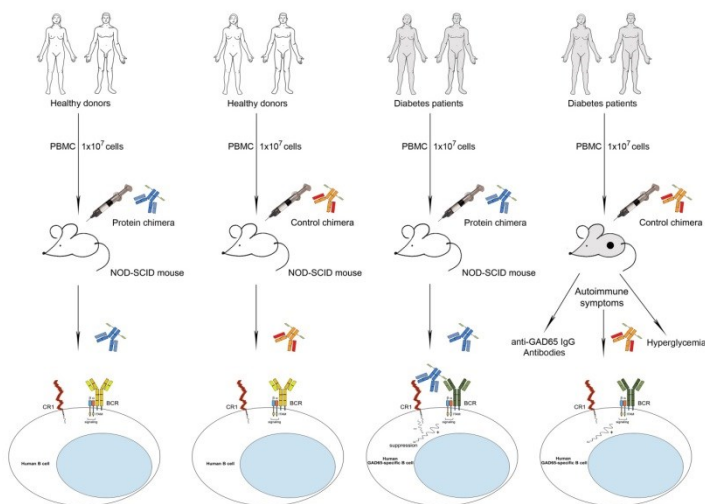
13. ELISpot за регистриране на GAD65-специфични IgG-секретиращи В клетки

Ефектът на химерните молекули върху броя на GAD65-секретиращи плазматични клетки беше определен чрез ензимно-свързан имуно-точков (ELISpot) метод. PBMC от нетретиранни пациенти с автоимунен диабет и здрави донори бяха култивирани в 96-ямкова плака за клетъчно култивиране за 3 дни (2×10^6 клетки/ml) в среда RPMI 1640 с 10% FCS в присъствието на различни концентрации от химерните молекули, контролната химера и пречистеното анти-CD35 анти тяло (40, 100, 250 и 625 ng/ml) при температура от 37 °C и наситеност на въздушната среда с 5% CO₂. За контроли на опитните ямки бяха използвани: 10 µg комбинация от двата пептида/10 µg/ml (5 µg p121-140 и 5 µg p270-289), 5 µg/ml липополизахарид (LPS от *Escherichia coli*, Sigma) или само клетъчна среда. На втория ден от инкубирането, 96-ямкови ELISpot плаки (Millipore, Бедфорд, САЩ) бяха активирани с етанол за една мин. След трикратно промиване с PBS, 10 µg комбинация от двата пептида/ml (5 µg p121-140 и 5 µg p270-

289) беше инкубирана за една нощ при температура 4 °C. На следващия ден плаката беше промита с PBS и блокирана с 1% разтвор на желатин в PBS за 30 мин. при стайна температура. След изтичане на инкубацията клетките от плаката за клетъчно култивиране бяха прехвърлени в плаката за ELISpot и тя беше инкубирана за още 4 часа на 37 °C при 5% CO₂. След трикратно промиване с T-PBS, ELISpot плаката беше инкубирана с античовешко IgG антители, конюгирано с алкална фосфатаза (Sigma) за 1 часа на стайна температура, след което беше проявена с NBT/BCIP (nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate) субстрат (Sigma). Количеството на точките, отговарящи на клетки произвеждащи IgG антитела срещу GAD65 беше определено с автоматичен ELISpot брояч C.T.L Immunospot S5 Versa Analyzer (Бон, Германия).

14. Трансфериране на мишки с човешки клетки

Групи от 8 седмични женски NSG мишки бяха приготвени за човешки клетъчен трансфер.



Фигура 1: Схема на трансфер и третиране на човешки клетки в имунодефицитни животни.

Получените от изолирането с Pancoll лимфоцити (от здрави донори и от пациенти) бяха трансферирани интраперитонеално (i.p.) с 1×10^7 клетки за всяка NSG мишка (фигура 1).

15. Схема на третиране

От всеки пациент с автоимунен диабет и от всеки донор бяха изолирани достатъчно лимфоцити, за да бъдат хуманизирани поне 2 животни - едно нетретирано (животно, нетретирано с химерите) и едно опитно (третирано с химерите GAD65 chimera 1 + GAD65 chimera 2). При изолиране на достатъчно клетки беше хуманизирано и още едно (контролно животно), което да бъде третирано с контролната химера.

Всички опитни животни бяха третирани с 50 μg от химерите (25 μg GAD65 chimera 1 и 25 μg GAD65 chimera 2), въвеждани i.p, веднъж седмично в продължение на 4 седмици. Всички контролни животни бяха третирани с 50 μg от контролната химера, въвеждана i.p, веднъж седмично в продължение на 4 седмици.

Мишките бяха кръвопускани преди всяка имунизация и в края на експеримента. Събраните серуми бяха съхранявани при -70°C .

16. Изолиране на човешки лимфоцити от слезка, лимфен възел и перитонеум на опитните животни

За анализиране на способността на химерите да повлияват човешки Б-лимфоцити беше необходимо слезките на опитни животни да бъдат отпрепарирани. Животните бяха жертвани чрез цервикална дислокация. Слезките им бяха отпрепарирани, след което структурата им беше нарушена посредством механично стриване и приминаване през мрежест филтър. Еритроцитите от получената суспензия бяха премахнати посредством инкубиране с карбонатен буфер за лизиране на еритроцити в продължение на 1 мин. След това буферът беше отстранен чрез центрофугиране при 1500

об./мин. на 4 °C за 10 мин., а спленоцитите - преброени и доведени до определена концентрация за съответните опити.

Дрениращият лимфен възел за панкреаса също беше отпредиран и обработен по същата методология.

Клетки от перитонеума на мишката бяха изолирани посредством лаваж на перитонеалната кухина с 5 ml топъл PBS и последващо обработване на клетъчната суспензия по гореописаната методология.

17. Анализ на клетките изолирани от опитните животните след 4 седмично третиране

Клетките изолирани от опитните животни, трансферирани с PBMC от пациенти с диабет тип 1 или здрави донори бяха промити с FACS буфер и подложени на анализ с проточен цитометър. Клетките бяха инкубирани с античовешки CD45-FITC, CD19-eFluor450, CD3-PE/Cy7, CD4-APC и CD8-PE за 30 мин. при 4°C. След края на инкубирането 30 000 клетки от всяка проба бяха анализирани с проточен цитометър BD LSR II.

18. Подготовка на хистологични препарати

След като животните от опитните и контролните групи бяха жертвани, техните панкреаси бяха подготвени за хистологично наблюдение под светлинен микроскоп. Панкреасите бяха фиксирани в 10% формалин в PBS, след което бяха обезводнени по стандартна схема с нарастваща концентрация на алкохоли и бяха включени в парафин. Парафиновите блокчета бяха оцветени с хематоксилин/еозин по стандартна процедура за хистопатологично изследване. Хистологичните препарати бяха наблюдавани и заснети под светлинен микроскоп (Nikon, Япония).

19. Статистически анализ

Стойностите от фигурите отговарят на средната стойност (mean) $\pm$ стандартното отклонение (SD). Статистическият анализ на данните беше извършен с помощта

на софтуер GraphPad Prism 5.0 (Ла Йола, САЩ). За статистически значима се приема разлика по-ниска от 0.05 ($p < 0.05$). Всички ELISA и ELISpot проби бяха утроени. При определяне разликите между две различни групи беше използван стандартен ANOVA тест.

III. Материали и методи. Част 2 – Миша моделна система

1. Моноклонални антитела

Плъща хибридома 2.4G2 (ATCC, HB-197), която продуцира IgG2 антитела, специфични към миши FcγRIIb беше адаптирана за растеж в безсерумна среда CHO (Thermo Fisher Scientific, Уолтъм, САЩ). Антителата от супернатантата бяха утаени по методологията, използвана при получаването на човешките CR1 (CD35) антитела. Получените FcγRIIb антитела бяха използвани за конструирането на миши химерни молекули и при конюгиране с FITC.

В тази част от дисертацията бяха използвани още анти-миши CD19-PE и CD19-eFlour450 антитела (eBioscience, Франкфурт, Германия) и пречистено анти-мише-CD32 антитяло (Abcam, Кеймбридж, Обединено кралство Великобритания и Северна Ирландия).

2. Определяне на потенциални епитопи от GAD65 посредством EpiDOCK

В мишата моделна система бяха използвани същите епитопи, получени при предварителния анализ EpiDOCK в хуманизираната моделна система.

3. Пептиди

Пептидните последователности от GAD 65 - YVVKSFDRSTKVIDFHYPNE и LPRLIAFTSEHSHFSLKKGA, които включват аминокиселини от 121 до 140 и от 270 до 289, включително, бяха използвани и при анализите в мишата моделна система. За конструиране на химерните молекули бяха използвани пептиди с добавени към тях Ahx-K-CONH₂

линкерни участъци - YVVKSFDRSTKVIDFHYPNE-Ahx-K-CONH₂, Ac-LPRLIAFTSEHSHFSLKKGA-Ahx-K-CONH₂, които да послужат за конструиране на активни химерни молекули.

4. Конструиране на химерни молекули

При конструирането на химерите за мишия модел бяха използвани пречистените анти-миши FcγRIIb антитела. Те бяха конюгирани по същата методология, като бяха използвани същите пептиди и същите моларни съотношения, както при конструирането на човешките химери. След пречистването и концентрирането на мишите химерни конструктори те бяха наименовани – mouse GAD65 chimera 1 и mouse GAD65 chimera 2.

5. Лабораторни животни

Използвани бяха 8-седмични женски C57BL/6J мишки, закупени от Jackson Laboratory (Бар Харбър, САЩ). Животните бяха отглеждани при стриктни SPF (specific-pathogen-free) условия в специално изграден вивариум. Експерименталната работа с животните и всички манипулации по настоящата работа бяха одобрени от Комисията за етична работа с лабораторни животни към Институт по Микробиология в съответствие с националните норми и законодателството на Република България (EU Directive 2010/63/EU).

6. Получаване на серуми от лабораторни мишки

Опитните животни бяха кръпопускани на всеки 7 дни, като беше използван ретро-орбиталният венозен синус. Серумите бяха получени след двукратно центрофугиране при 1500 об./мин. на 4 °C за 10 мин., след което бяха съхранявани при –70 °C.

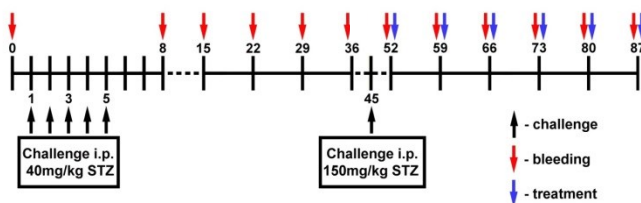
7. Стрептозотоцин-индуциран миши модел на диабет тип 1

За да бъде разработен миши модел на диабет тип 1 в експерименталните животни беше използван Стрептозотоцин (Streptozotocin, STZ, Sigma). Той беше разтворен в 25 mM

натриево-цитратен буфер (натриев цитрат/ лимонена киселина) с рН 4.0. Така полученият разтвор беше въведен интраперитонеално (i.p.) в опитните животни до 15 минути след приготвянето. Дозата STZ, която всяко животно получи беше 40 mg/kg. Мишките бяха третираны по този начин в продължение на 5 последователни дни, а 45 дни след първата инжекция получиха допълнителна доза STZ (150 mg/kg) интраперитонеално (i.p.). Нивото на глюкоза в кръвта на всяко животно беше следено всяка седмица с помощта на глюкомер за кръвна захар Accu-Chek (Roche Diabetes Care). Мишки, чиято кръвна захар беше с нива по-високи от 250 mg/dL (13.9 mmol/L) бяха считани за болни от диабет и бяха включени в експеримента.

8. Схема на третиране на лабораторните животни

Групи от женски C57BL/6J (n=10) болни от диабет, предизвикан от инжектиране на STZ бяха имунизирани всяка седмица интраперитонеално с 50 µg/мишка комбинация от химерните молекули (25 µg GAD65 chimera 1 и 25 µg GAD65 chimera 2). Началото на третирането беше на ден 52 от първата инжекция със STZ. Контролна група животни (n=10) със STZ-индуциран диабет беше инжектирана единствено с PBS, като беше спазван същият график. Група здрави животни (при които не беше индуциран диабет) (n=10) беше инжектирана с PBS. Всяка седмица опитните животни бяха кръвопускани, а нивото на кръвната им захар беше следено (**Фигура 2**).



Фигура 2: Схема на индуциране и третиране на автоимунен диабет тип 1 в C57BL/6J мишки.

9. Изолитране на лимфоцити от слезка на опитните животни

За анализиране на способността на химерите да разпознават миши Б-лимфоцити беше необходимо слезките на опитни животни да бъдат отпрепарирани и да бъдат подложени на обработване подобно на слезките на опитните животни в човешката моделна система.

10. Анализ с проточен цитометър на свързването на химерите в мишия модел

Изолитраните лимфоцити от слезките на опитните животни (спленоцити) бяха доведени до концентрация 1×10^6 клетки/ml и обработени по протокола в човешката моделна система. След двукратно промиване бяха инкубирани само с PBS или с mouse GAD65 chimera 1, или mouse GAD65 chimera 2 ($1 \mu\text{g}/10^6$ клетки). Инкубирането беше последвано от още едно инкубиране с анти-FcγRIIb антиляло, конюгирано с FITC, и с анти-CD19 антиляло, конюгирано с PE. Всяко инкубиране беше проведено за 20 мин. на лед. От всяко опитно животно бяха анализирани по 10 000 клетки.

11. Подготовка на хистологични препарати

Панкреасите на животните от опитните и контролните групи бяха подготвени за хистопатологично наблюдение под светлинен микроскоп със стандартно хематооксилин/еозин оцветяване, описано в човешката моделна система.

12. Измерване на нивата на апоптоза

Изолитраните спленоцити от опитните животни (опитни и контролни) бяха третираны по метод, идентичен на описания в човешкия модел. В този модел, при тридневното култивиране на клетките бяха използвани 40, 100, 250 и 625 ng/ml от mouse GAD65 chimera 1 и mouse GAD65 chimera 2. Клетките бяха белязаны с e-Fluor 450 конюгирано анти-CD19 антиляло. Нивото на апоптоза беше определено с помощта на Annexin V-FITC apoptosis detection Kit (eBioscience).

13. ELISpot за регистриране на GAD65-специфични IgG-секретиращи В клетки

Изолерираните спленоцити от мишките третираны със STZ и нетретираните контролни животни бяха култивирани при концентрация (2×10^6 кл/ml) в продължение на 3 дни в среда RPMI 1640 и при различни концентрации на химерните молекули (подобно на човешкия модел). Клетките бяха стимулирани с комбинация от 10 μ g пептиди (5 μ g пептид 121–140 + 5 μ g пептид 270–289), 5 μ g /ml LPS или само клетъчна среда (използвани като контроли). Плаките бяха обработени по стандартна методология, като при последното инкубиране беше използвано антимише IgG антицяло, конюгирано с алкална фосфатаза, инкубирано за 1 час и проявено със субстрата NBT/BCIP. Броят на плазмоцитите, отделящи анти-GAD65 IgG антитела беше определена посредством преброяване на цветните точки върху мембраната с помощта на автоматичен ELISpot брояч C.T.L Immunospot S5 Versa Analyzer.

14. Статистически анализ

Стойностите от фигурите отговарят на средната стойност (mean) $\pm$ стандартното отклонение (SD). Статистическият анализ на данните беше извършен с помощта на софтуер GraphPad Prism 5.0 (Ла Йола, САЩ). За статистически значима се приема разлика по-ниска от 0.05 ($p < 0.05$). Всички ELISA и ELISpot проби бяха утроени. При определяне разликите между две различни групи е използван стандартен ANOVA тест.

IV. Резултати. Част 1 – Хуманизирана моделна система

1. Определяне на потенциални епитопи от GAD65 посредством EpiDOCK

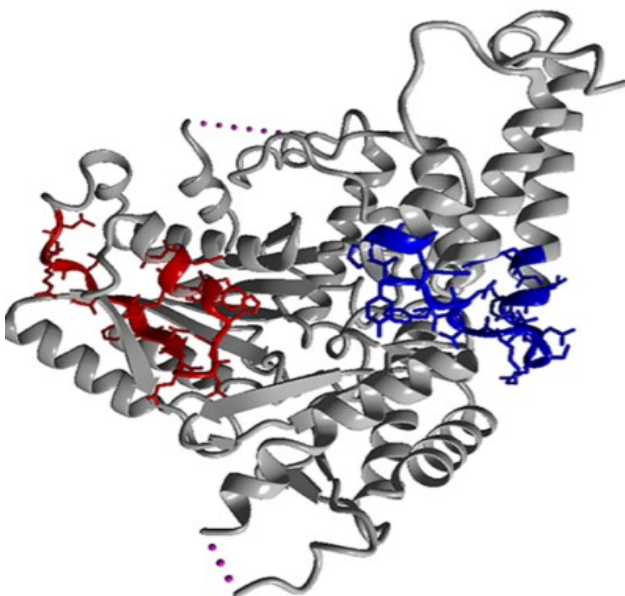
Четири известни CD4 Т-клетъчни епитопа от GAD65 бяха избрани с помощта на алгоритъма EpiDOCK, въз основа на следните критерии: (Di Lorenzo, Peakman et al. 2007, Erlich, Valdes et al. 2008)

- дължина от 20 аминокиселинни остатъка
- DQ8 или DR MHC молекули включени в отговора
- тип на Т-клетъчния отговор

Избраните пептиди са разположени на различни места в молекулата на GAD: 121-140, 201-220, 270-289 и 556-575 аминокиселина. В рамките на *in silico* анализ за наличие на 9-мерни последователности, които да се свържат към хаплотипи DQ8 (DQA1*03:01/DQB1*03:02), DRB1*04:01 и DRB1*04:05, бяха получени следните резултати:

- Пептид 121–140 съдържа 7 участъка, които могат да се свържат към DQ8 и един към DRB1*04:05.
- Пептид 201–220 съдържа 6 участъка, които могат да се свържат към DQ8.
- Пептид 270-289 съдържа 6 участъка, които могат да се свържат към DQ8 и два към DRB1*04:05.
- Пептид 556–575 съдържа 7 участъка, които могат да се свържат към DQ8.

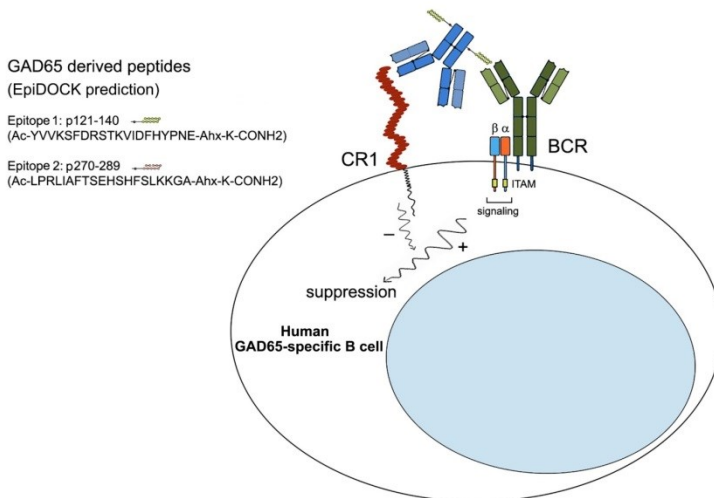
За пептид 121-140 и за пептид 270-289 не беше известно до този момент, че са разпознавани от DQ8, DRB1*04:01 и DRB1*04:05. При конструирането на човешките химерни молекули бяха използвани именно те (**Фигура 3**).



Фигура 3: Структура на GAD65. В синьо е означен пептид 121-140. В червено е означен пептид 270-289.

2. Конструирание на контролна химера, GAD65 chimera 1 и GAD65 chimera 2 молекулите

Новоконструираните химерни молекули (GAD65 chimera 1, GAD65 chimera 2 и контролна химера) бяха получени чрез химична конюгация на няколко копия на пептиди 121-140, 270-289 и контролен пептид (за всяка химера съответно) към моноклонално анти-човешко CD35 антитяло (клон 3D9) (Фигура 4).



Фигура 4: Схема на свързването на синтезирана химерна молекула към CR1 и BCR върху човешки GAD 65 специфични Б-клетки.

3. GAD65 chimera 1 и GAD65 chimera 2 свързват преимуществено CD19⁺ клетки в PBMC от пациенти с диабет тип 1 и здрави донори

След като химерите бяха конструирани проверихме функционалността на двата елемента от химерния конструктор (Фигура 5).

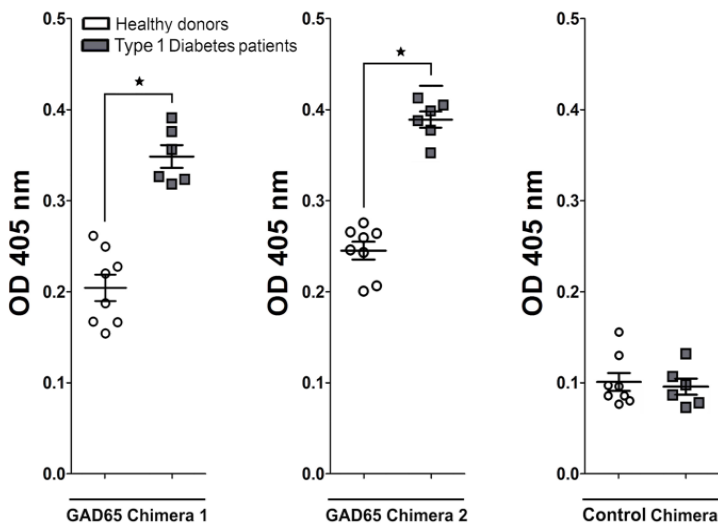
Съществуващите свободни карбоксилни групи по повърхността на антиялото могат да взаимодействат с реактивоспособните аминок-групи на Ahx-линкерния участък (ε-амино-групата на лизина) в карбоксилния край на синтезираните пептиди, но само няколко от тях са свободни за свързване. Някои от тези групи са разположени във вътрешността на участъка за свързване на антигена и поради това конюгирането на пептидите не би трябвало да им се отрази. За да изключим възможността за подобно свързване проведохме FACS анализ за конкурентно свързване. Така проверихме капацитета на химерните молекули да се свързват към Б- и Т-клетки, изолирани от пациенти с диабет тип 1 или здрави донори. Конкурентното свързване проведохме чрез последващо инкубиране на пре-инкубираните с химери клетки с анти-CD35 антияло (клон 3D9) конюгирано с FITC. Химерните молекули GAD65 chimera 1 и GAD65 chimera 2 запазиха способността си да взаимодействат със CD19+ клетки и блокираха свързването на анти-CD35-FITC антияло към CD35+ клетки при пациенти и здрави донори. Това не беше установено при CD3+ популацията от изследваните клетки, като блокиране на връзването не беше установено и при конкурентно инхибиране с анти-CD35 неконюгирано антияло.

4. Пептидният компонент на химери GAD65 chimera 1 и GAD65 chimera 2 е разпознаван от антитела в серуми на пациенти с диабет тип 1

След първоначалните тестове изследвахме способността на пептидният компонент от химерите (пептидните епитопи от GAD65) да бъдат разпознавани от антитела в серумите на пациенти и здрави донори. GAD65 chimera 1, GAD65 chimera 2 и контролна химера бяха натоварени върху ELISA плаки и в следствие инкубирани с разредени серуми от пациентни с диабет тип 1 или здрави донори (**Фигура 6**).

Епитопите от GAD65 и в двете експериментални химери бяха разпознати от анти-GAD65 IgG антитела в

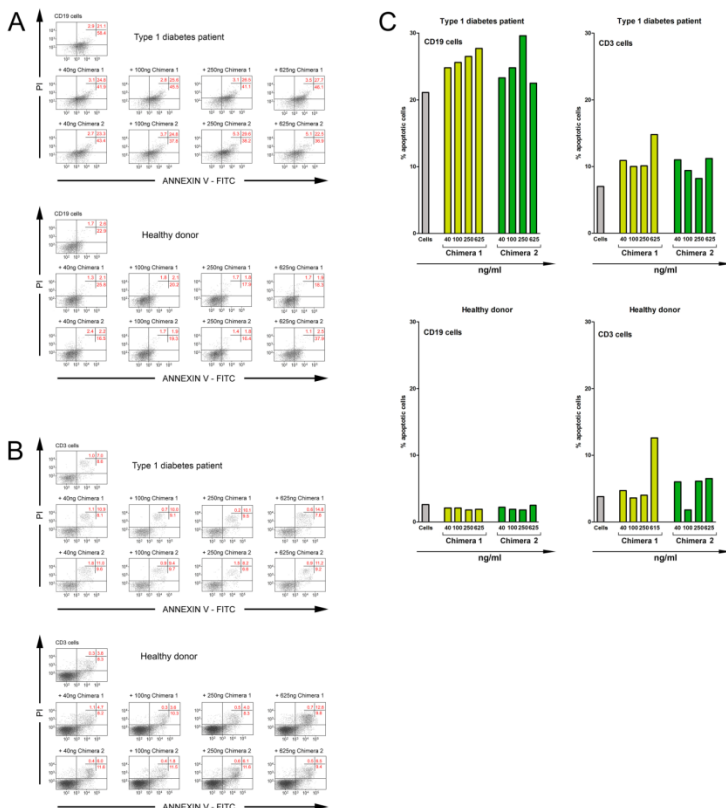
серумите на пациенти с диабет тип 1, докато разпознаването от здрави донори беше по-ниско. Контролният пептид от контролната химера не беше разпознат от IgG антитела в серумите на пациенти и здрави донори.



Фигура 6: ELISA за определяне на достъпността на епитопите от GAD65. Пептид 1 и Пептид 2, конюгирани за антиCD35 антитялото, са разпознавани от анти-GAD65 антитела. Пептидните компоненти от GAD65 chimera 1 и GAD65 chimera 2 са разпознавани от анти-GAD65 антитела. Експерименталните химери и контролната химера бяха натоварени върху ELISA плаки и бяха инкубирани със серуми от пациенти с диабет тип 1 и здрави донори. След края на инкубирането, плаките бяха измити, инкубирани с анти-човешки IgG антитяло, конюгирано с Алкална фосфатаза и проявени. Стойността Р беше изчислена посредством стандартен ANOVA тест (* $P < 0.05$).

5. Химерите GAD65 chimera 1 и GAD65 chimera 2 повишават процента на апоптиралите Б- и Т-лимфоцити в пациенти с диабет тип 1

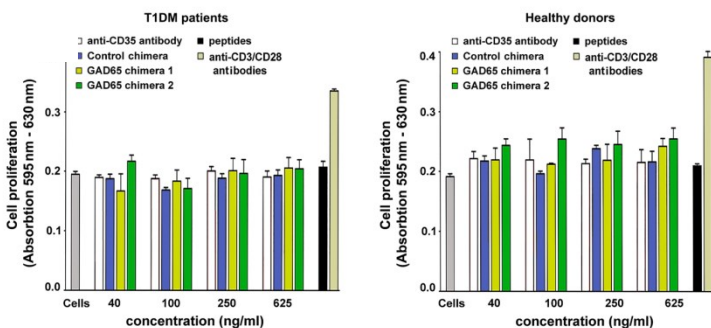
Изолираните РВМС от диагностицирани пациенти с диабет тип 1 и здрави донори бяха използвани, за да проверим про-апоптичния ефект на химерите, използвани в човешкия модел. Клетките бяха култивирани съвместно с химерни молекули в продължение на 3 дни и в следствие посредством проточен цитометър беше проверено нивото на експресия на фосфатидил серин по повърхността на CD3⁺ и CD19⁺ клетки. Броят на апоптиралите клетки в популациите на нетретиран Б- и Т- клетки от здравите донори беше значително по-нисък отколкото при CD3⁺ и CD19⁺ популациите от клетки от пациенти. С повишаването на концентрацията на химерите, процентът на апоптирали CD19⁺ клетки се повиши (**Фигура 7**). Подобно явление не беше наблюдавано в CD3⁺ популацията след инкубиране със същата концентрация на химерите.



Фигура 7: Изследване на про-апоптичния ефект на химерните молекули върху В- и Т-лимфоцити. Изолирани PBMC от пациенти с диабет тип 1 и здрави донори бяха третирани по отделно с нарастващи концентрации от GAD65 chimera 1, GAD65 chimera 2 или култивирани със среда в продължение на 3 дена. След това клетките бяха оцветени с annexinV/PI и анализирани с проточен цитометър. Плотове показват процента на двойно положителните клетки, в рамките на популациите на В-клетките (**A**) и Т-клетките (**B**). При графичното представяне (**C**) резултатите са представен със средно отклонение $\pm$ (SEM) ($n = 3$) (* $P < 0.05$). Описаният експеримент е представителен от 5те опита.

6. Химерните молекули не повлияват клетъчната пролиферация *in vitro*

За да определим ефекта от третирането с GAD65 chimera 1 и GAD65 chimera 2 върху клетъчната пролиферация проведохме колориметричен тест с МТТ (**Фигура 8**). PBMC от пациенти с диабет тип1 и здрави донори бяха култивирани *in vitro* съвместно с двете химери в различни концентрации или с неконюгирано анти-CD35 антитяло в продължение на 3 дни.



Фигура 8: МТТ анализ на влиянието на химерните молекули върху пролиферативната способност на клетки изолирани от здрави донори и диабетни пациенти. GAD65 химерните молекули не потискат пролиферацията на PBMC *in vitro*. PBMC от пациенти с диабет (ляв панел) и здрави донори (десен панел) бяха култивирани в различна концентрация на химерните молекули, контролната химера и неконюгирано анти-CD35 антитяло. Контролни ямки бяха стимулирани с предварително натоварени на плаката анти-човешки CD3/CD28 антиела, с пептидният компонент на химерите или само със среда за култивиране. Клетъчната пролиферация беше оценена посредством МТТ анализ и резултатите бяха сравнени с нетретираните клетки. Осреднените резултати са представени със средно отклонение $\pm$ SD при 3 повторения. Статистическият анализ беше проведен със стандартен ANOVA анализ (*P < 0.5; **P < 0.01; ***P < 0.001). Резултатите са представителни за 6 независими експеримента.

Третираните клетки не бяха стимулирани в рамките на целия период на изследване, докато контролни проби с клетки

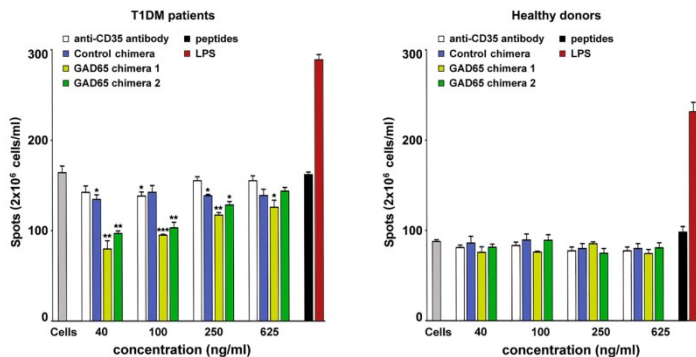
от пациенти и здрави донори, стимулирани с анти-CD3/CD28 антитела демонстрираха висока пролиферативна активност. Стимулирането на клетките единствено с пептиди не доведе до промяна в пролиферацията им. Като краен резултат може да се заключи, че в *in vitro* условия не беше наблюдавана статистически значима промяна в пролиферацията на клетки от пациенти и здрави донори.

7. Химери GAD65 chimera 1 и GAD65 chimera 2 потискат Б-клетъчната диференциация в анти-GAD65 анти тяло-продуциращи плазматични клетки

Посредством ELISpot техника беше установен броят на плазмоцитите, секретирани GAD65 специфични IgG антитела. При това изследване броят на точките в рамките на една ямка отговаря на броя на клетки, продуциращи антитела с тази специфичност.

В съседни ямки бяха добавени нарастващи концентрации от химерите, които бяха инкубирани съвместно с клетки от пациенти с диабет и здрави донори в среда RPMI-1640 без специфични стимулатори за Б- и Т-клетки.

Третирането с химерите значително намали броя на анти-GAD65 IgG секретиращите плазматични клетки в пациенти с диабет тип 1. Най-голямо намаляване на броя на плазматичните клетки беше наблюдавано при клетки от пациенти, инкубирани с 40 и 100 ng/ml от двете химери (GAD65 chimera 1 и GAD65 chimera 2). Същите експерименти бяха проведени и с PBMC от здрави донори, но разлика между нетретираните и клетки, третирани с химерите не беше наблюдавана (Фигура 9).



Фигура 9: ELISpot анализ за определяне на броя анти-GAD65 IgG антияло-продуциращи плазматични клетки след третиране с химерните молекули. Броят точки отговаря на броя анти-GAD65 IgG антияло секретиращи плазматични клетки. Той беше определен чрез ELISpot анализ. Изолирани PBMC клетки бяха култивирани съвместно с GAD65 chimera 1, GAD65 chimera 2, контролната химера и неконюгирано анти-CD35 антияло и всеки диабетен донор (ляв панел) или пациент (десен панел) беше тестван по отделно. Контролни клетки бяха стимулирани с пептидни епитопи на GAD65, с липополизахарид (LPS) или само със среда за култивиране. Броят на точките в опитните ямки от пациенти или здрави донори беше сравнен с нестимулираните клетки (клетки култивирани в среда). Осреднените резултати са представени със средно отклонение $\pm$ SD при 3 повторения. Статистическият анализ беше проведен със стандартен ANOVA анализ (* $P < 0.5$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Резултатите са представителни за 6 независими експеримента.

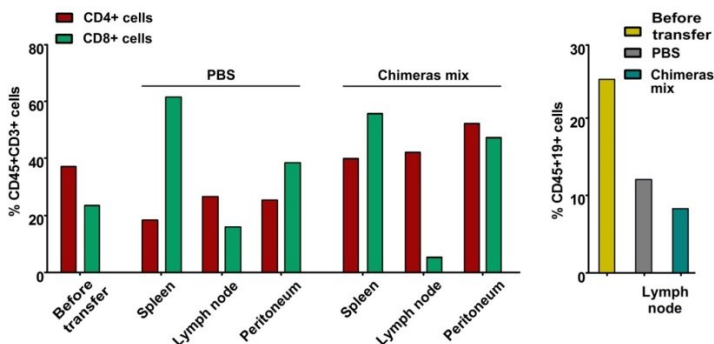
8. След трансфер в имунодефицитни животни, лимфоцитите от здрави донори и диабетни пациенти имат различно процентно разпределение в различни тъкани и органи

30 дена след трансфера на човешките клетки в NSG мишки, лимфоцитите от различни популации (CD45+CD19+ и CD45+CD3+) бяха открити в слезката, в лимфния възел,

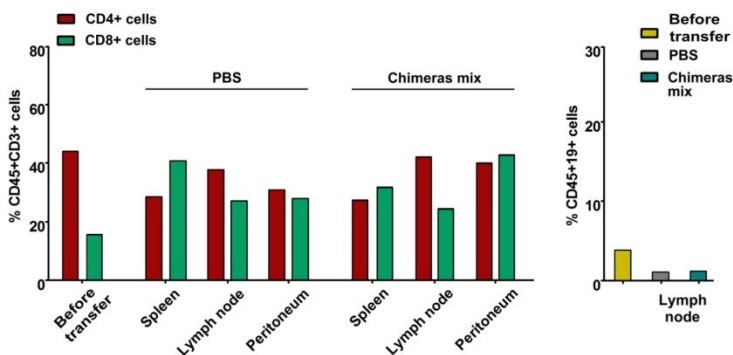
дрениращ панкреаса и в перитонеума на опитните животни в различни процентни съотношение.

При експерименталното животно, трансферирано с PBMC от пациент с диабет тип 1 и третирано с химерни молекули установихме повишаване в броя на CD4⁺ клетките (като част от CD45+CD3⁺ популацията), сравнено с нетретирано животно. Установено беше още, че броят на CD19⁺ клетките намалява при третиране с химерните молекули (Фигура 10).

При животното, хуманизирано с PBMC от здрав донор, не беше открита явна закономерност. Количеството Б-клетки не бяха достатъчно за анализ в рамките на CD45⁺ популацията (Фигура 11).



Фигура 10: А: Анализ с проточен цитометър на човешки клетки в слезката, перитонеума и лимфни възли на хуманизирани NSG мишки 30 дена след трансфера с PBMC от диабетни пациенти. След като клетките бяха изолирани от съответните органи, бяха инкубирани с анти-CD45, анти-CD3, анти-CD19, анти-CD4 и анти-CD8 антители за 30 мин. на 4°C. След промиване, клетките бяха анализирани на проточен цитометър. **Б:** Таблица с процентното съотношение между CD4⁺/CD8⁺ клетките в популация от CD45+CD3⁺ лимфоцити.



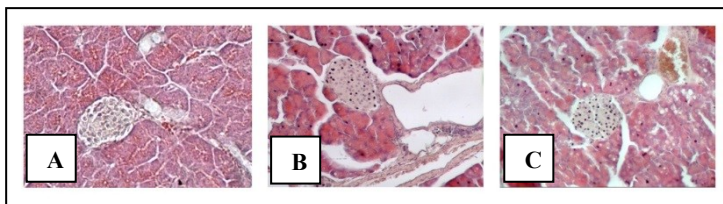
	Мишки третирани с PBS			Мишки третирани с Химери		
преди трансфер	слезка	лимфен възел	перитонеум	слезка	лимфен възел	перитонеум
2.38	0.75	1.33	1.05	0.85	2.05	0.97

Фигура 11: А: Анализ с проточен цитометър на човешки клетки в слезката, перитонеума и лимфни възли на хуманизирани NSG мишки 30 дена след трансфера с PBMC от здрави донори. След като клетките бяха изолирани от съответните органи, бяха инкубирани с анти-CD45, анти-CD3, анти-CD19, анти-CD4 и анти-CD8 антители за 30 мин. на 4°C. След промиване, клетките бяха анализирани на проточен цитометър. **Б:** Таблица с процентното съотношение между CD4+/CD8+ клетките в популация от CD45+CD3+ лимфоцити.

9. След трансфер в имунодефицитни NSG мишки, в панкреасите на опитните животни бяха открити инфилтрати от имунни клетки, но не беше доказан пряк ефект от действието на химерните молекули

След трансферирането на имунодефицитни NSG мишки с имунни клетки на здрави донори и на пациенти с автоимунен диабет, опитните животни бяха третирани веднъж седмично в продължение на един месец с комбинация от GAD65 chimera 1 и GAD65 chimera 2. Контролни животни – трансферирани с клетки от диабетен пациент и нетретирани с химери, и трансферирани с клетки от здрав донор бяха

инжектирани с PBS. Една седмица след последното инжектиране животните бяха жертвани, а панкреасите им използвани за изработването на хистологични препарати. При мишките трансферирани с клетките от диабетен пациент бяха открити инфилтрати от имунни клетки в областите около и върху самите острови на Лангерханс. Подобни инфилтрати не бяха открити в панкреасите на животните, хуманизирани с клетки от здрав донор. (Фигура 12)

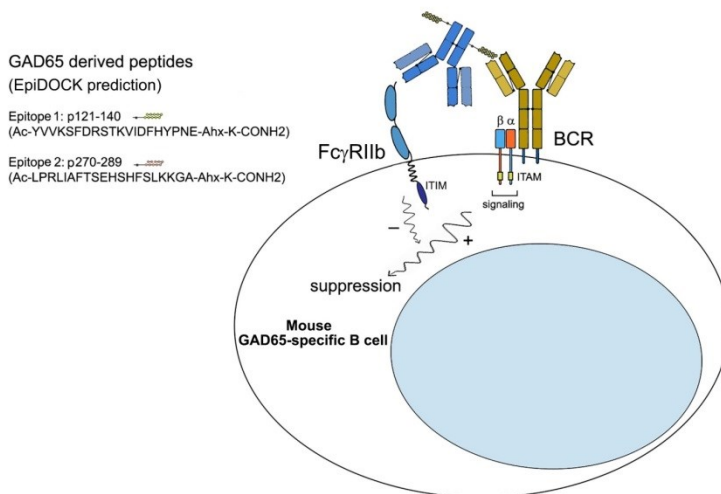


Фигура 12: Микроскопски анализ на панкреаси на експериментални животни хуманизирани с клетки от здрав донор. След жертване на животните, панкреасите им бяха отпрепарирани, фиксирани във формалин и оцветени със стандартно оцветяване Хематоксилин/Еозин. Снимка на остров на Лангерханс на животно, трансформирано с клетки на здрав донор (А), с клетки от диабетен пациент и третирани с PBS (В) и с клетки от диабетен пациент и третирани с комбинация от опитните химерни молекули (С).

IV. Резултати. Част 2 – Миша моделна система

1. Конструирание на химерните молекули mouse GAD65 chimera 1 и mouse GAD65 chimera 2

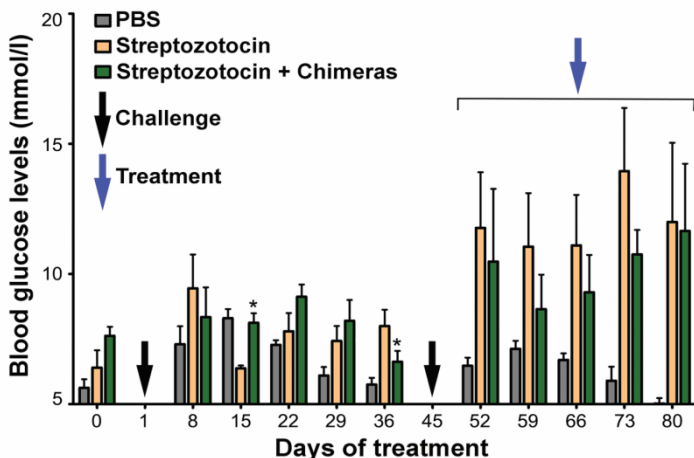
С помощта на EpiDOCK бяха избрани 2 потенциални епитопа – 121-140 (който съдържа седем DQ8 и един DRB1*04:05 участъка за захващане) и 270-289 (който съдържа шест DQ8 и два DRB1*04:05 участъка за захващане), от молекулата на GAD65, аналогични на използваните за хуманизирания модел. С помощта на химична конюгация, няколко еднакви копия от синтезираните пептиди бяха закачени към моноклонално анти-мише FcγRIIb антитяло 2.4G2 (Фигура 13).



Фигура 13: Едновременното свързване на синтезираната химерна молекула към FcγRIIb и BCR върху GAD 65 - специфични Б-клетки.

2. Протеиновите химерни молекули mouse GAD65 chimera 1 и mouse GAD65 chimera 2 допринасят за намаляването на кръвната захар в STZ-предизвикан диабет тип 1 в мишки от линия C57BL/6J

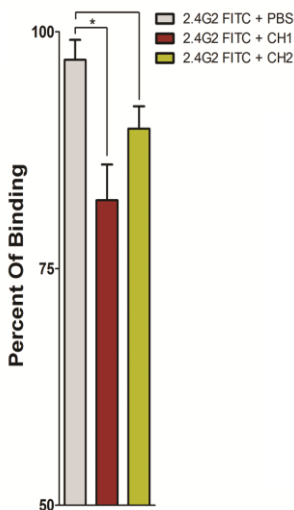
Кръвната захар на всички животни в опитните групи беше измервана всяка седмица, в определен ден от седмицата, в един и същи час, без животните да са гладували. При третирането с химерните молекули на животни развили автоимунен диабет в рамките на следващите 5 седмици, нивото на кръвната захар беше по-ниско, отколкото в контролните групи - нетретиранни със STZ и инжектирани с PBS и третиранни със STZ и инжектирани с PBS (**Фигура 14**).



Фигура 14: Нива на кръвната захар в експериментални нетретиращи животни и експериментални животни, инжектирани със STZ и третиращи с химерните молекули. Осреднените резултати са представени със средно отклонение $\pm$ SD.

3. Химерните молекули запазват способността си да се свързват за съответните рецептори-мишени

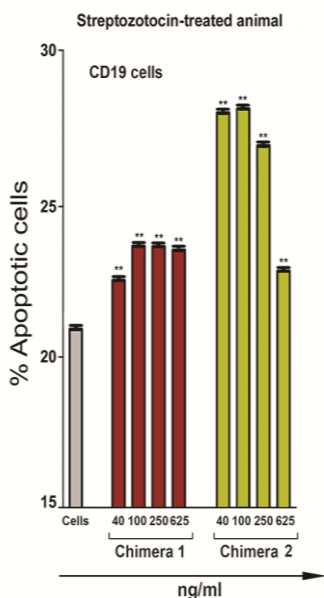
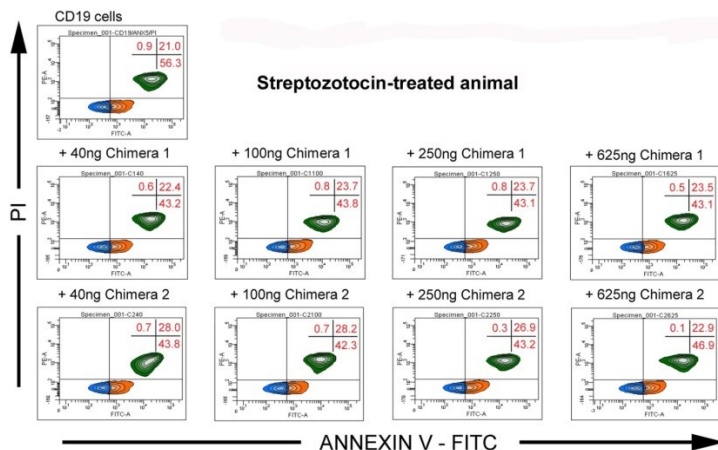
Специфичността на конструирания молекули, mouse GAD65 chimera 1 и mouse GAD65 chimera 2, да се свързват към рецепторните им мишени беше доказана посредством конкурентно свързване към рецептора (**Фигура 15**). Слезки на мишки, третиращи със STZ бяха отпрепарирани и получената спленоцитна суспензия беше инкубирана с анти-CD19 антители и в последствие с химерните молекули и анти-Fc γ RIIb антители, конюгирано с FITC. Пробите бяха анализирани на проточен цитометър. И двете химери демонстрираха запазена способност да се свързват с рецепторите и блокираха захващането на FITC-конюгираното анти-CD19 антители със същата специфичност.



Фигура 15: Химерните молекули mouse GAD65 chimera 1 и mouse GAD65 chimera 2 запазват способността си да се свързват за мишки Б-лимфоцити. Спленоцити от мишки с предизвикан от STZ диабет бяха кокултивирани *in vitro* с химерните молекули или с PBS. След това клетките бяха инкубирани с анти- FcγRIIb антитяло, конюгирано с FITC, комбинирано с инкубиране с анти-CD19-PE и в последствие анализирано на проточен цитометър.

4. Mouse GAD65 chimera 1 и mouse GAD65 chimera 2 повишават броя на апоптиралите специфични Б-клетки в мишки третиран с Стрeптoзoтoцин

Изолирани спленоцити от здрави животни и мишките стимулирани със STZ (третиран с PBS и с mouse GAD65 chimera 1 и mouse GAD65 chimera 2) бяха подложени на анализ за изследване на про-апоптичния ефект от терапията (**Фигура 16**). Експресията на фосфатидилсерин на повърхността на CD19+ клетки беше анализирана чрез проточен цитометър след тридневно инкубиране с различни концентрации от протеиновите химерни молекули. И двете химери предизвикаха дозо-зависимо повишаване на апоптиралите Б-клетки в мишки, третирани със STZ. Резултатите, получени при инкубиране с mouse GAD65 chimera 2 доказаха по-големия про-апоптичен потенциал на молекулата, сравнено с mouse GAD65 chimera 1. Лимфоцитите, изолирани от мишки нетретирани със STZ не бяха повлияни при инкубирането с химерните молекули.

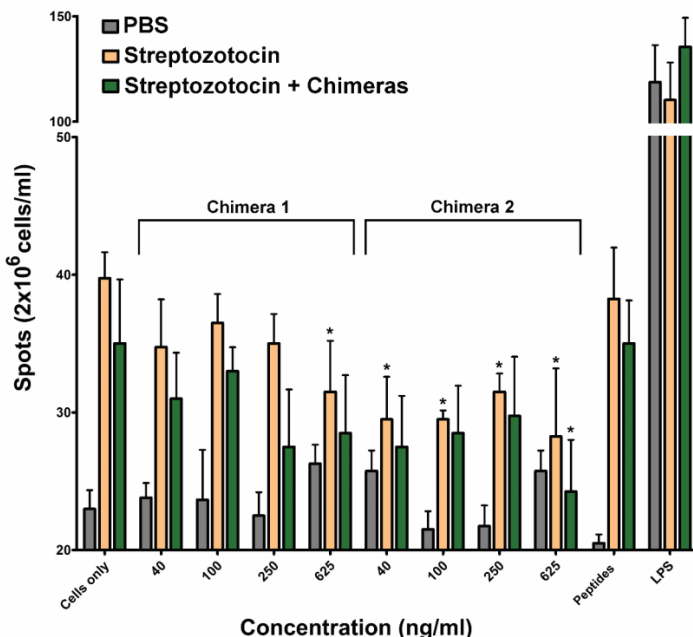


Фигура 16: Химерните молекули mouse GAD65 chimera 1 и mouse GAD65 chimera 2 предизвикат повишени нива на апоптоза в популацията CD19⁺ клетки от мишки третираны със STZ. Изолирани спленоцити от мишки с предизвикан диабет бяха третираны с нарастващи концентрации от mouse GAD65 chimera 1, mouse GAD65 chimera 2 или PBS в продължение на 3 дена. След това, клетките бяха оцветени специфично с Annexin V-FITC/PI оцветяване и анализирани на проточен цитометър. Плотове (горен панел) представят процента двойно-положителни клетки в рамките на популацията от CD19⁺ клетки. Резултатите представени графично (долен панел) са представени с отклонение $\pm$ SD. Статистическата достоверност беше определена посредством ANOVA тест (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Представен е един от 4 експеримента.

5. Конструираниите химерни молекули потискат диференцирането на специфични към GAD65 Б-клетки до авто-антитяло секретиращи плазмоцити.

Посредством ELISpot техника беше оценен потенциалът на химерните молекули в мишия модел да повлияят на анти-GAD65 антитяло-продуциращи Б-клетки.

Преди провеждането на ELISpot анализа, спленоцитите бяха култивирани в продължение на 3 дена при 37 °C и 5% CO₂ наситеност на въздуха в среда RPMI-1640 без специфична Б- и Т-клетъчна стимулация и към тях бяха прибавени нарастващи концентрации от съответните химери. Третирането на спленоцитите с двете химери предизвика дозо-независимо понижаване в броя на *in vitro* диференцираните анти-GAD65 IgG антитяло-продуциращи клетки в групите животни, стимулирани със STZ и третирани *in vivo* с химерните молекули (Фигура 17).

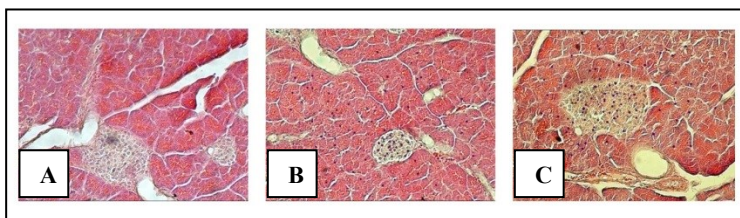


Фигура 17: GAD65-специфичните химери повлияват диференцирането на прицелните GAD65-автореактивни Б-клетки. Слезки от мишки C57BL/6, развили диабет, бяха култивирани с опитните химери или само със среда в продължение на 3 дена. Контролни ямки бяха стимулирани с комбинация от пептидните епитопи на GAD65 или с LPS. Броят на точките, който отговаря на броя на анти-GAD65 IgG секретиращи плазматични клетки беше определен с помощта на ELISpot метод и сравнен с контролните клетки (инкубирани в среда). Резултатите са осреднени за три ямки. Стойността на доверителния интервал беше изчислена посредством стандартен ANOVA тест (* $p < 0.05$). Представен е резултат от 4 независими експеримента.

Прибавянето на бактериален липополизахарид (LPS) повиши броя на антияло-секретиращите клетки. Добавяне единствено на двата пептидни епитопа не доведе до повишаване на клетките, които отделят антитела, което показва, че повечето изследвани специфични Б-клетки вече са били активирани.

6. Химерните молекули mouse GAD65 chimera 1 и mouse GAD65 chimera 2 не повлияват количествено инфилтратите от клетки в панкреасите на мишки стимулирани със Стрептозотоцин

След като опитните животни от трите групи (PBS, нетретиран и третиран с химери) в мишия модел бяха жертвани, панкреасите им бяха обработени по протокол и бяха изработени микроскопски препарати, оцветени със стандартно оцветяване хематоксилин-еозин. Инфилтратите от клетки на имунната система върху панкреасите в STZ-стимулираните животни са видими, но няма явна разлика в броя на тези клетки след третиране с химерните молекули (**Фигура 18**).



Фигура 18: Микроскопски анализ на панкреаси на експериментални животни от здрави животни (**A**), животни стимулирани със STZ и нетретиран с химери (**B**) и животни стимулирани със STZ и третиран с комбинация от химерните молекули (**C**).

V. Дискусия

Независимо, че автоимунният диабет е все по-често срещано заболяване в световен мащаб, не е напълно ясно какво причинява развитието на това патологично състояние. Като основни причини учените определят фактори на околната среда, вирусни инфекции и генетична предразположеност. (Erlich, Valdes et al. 2008) В продължение на много години, изследователите отчитаха несъмнената роля на CD8⁺ Т-клетките в развитието на болестта. Цитотоксичните Т-клетки, съвместно със CD4⁺ Т-клетките, обуславят автореактивната активация на имунната система и послеващото разрушаване на панкреатичните бета-клетки. За тези изследвания помагат множество животински модели, най-популярният от които са мишки от линията NOD. (Pinkse, Tysma et al. 2005, Phillips, Parish et al. 2009) Б-клетките са известни не само със способността си да отделят антитела, но и като много ефикасни антиген-представящи клетки. Едва през последните години учените насочват вниманието си към тази способност на Б-лимфоцитите и ефекта, който те биха имали върху активността на Т-регулаторните клетки. (Pihoker, Gilliam et al. 2005) Различни изследвания доказват, че представянето на Т-клетъчни епитопи от GAD65, които са част от Б-клетъчни епитопи, е намалено или блокирано, докато Т-клетъчни епитопи, които не се припокриват със специфичност на антитела са представяни много по-ефикасно. (Jaume, Parry et al. 2002, Banga, Moore et al. 2004) Учените предполагат, че скриването на Т-клетъчни епитопи по този начин неутрализира тяхното представяне.

Посредством използването на повърхностни молекули, специфични за Б-клетките, е възможно да бъде повлияно тяхното развитие. Подобна стратегия е използвана при лечение на ревматоиден артрит и СЛЕ, като за целта е използвано моноклоналното антитяло Ритуксимаб. То разпознава молекулите CD20 на повърхността на Б-клетките и предизвиква тяхното отстраняване посредством лизис, следствие от свързване на Fc рецептори и активиране на каскадата на комплемента. (Anolik, Barnard et al. 2007, Pescovitz, Greenbaum

et al. 2009) Независимо от положителното повлияване на състоянието на пациентите с автоимунни заболявания, CD20 отсъства по повърхността на Б-клетъчните прекурсори и дългоживущите плазматични клетки. (Hammarlund, Thomas et al. 2017)

Друго възможно решение е потискане активирането на Б-клетъчната пролиферация посредством анти-CD22 антитялото Епратузимаб, комбинирано с блокиране на ко-стимулаторните рецептори от Lympho-Stat-B. За жалост, все още няма дългосрочни повтаряеми, положителни резултати от подобна терапия. (Dörner, Kaufmann et al. 2006, Baschal, Baker et al. 2011) Нивата на Б-клетъчния активиращ фактор (BAFF) са повишени в кръвта на пациенти с РА и СЛЕ. Факторът APRIL също е определян за основен при Б-клетъчната пролиферация и развитие. През последните години учените изследват възможността за съвместно блокиране на рецепторите за BAFF и APRIL чрез специфични антитела. (Browning 2006, Mahévas, Michel et al. 2013, Hinman, Smith et al. 2014) Тези подходи, обаче, не са специфични, тъй като отстраняват всички Б-клетки и като следствие пациентите са в частично имунодефицитно състояние. Възможен механизъм за специфично потискане на активността на В-клетки е да бъдат омрежени повърхностни имуноглобулинови рецептори (BCR) и блокиращ Б-клетъчен рецептор посредством белтъчни химерни молекули.

С напредването на диабетното автоимунно състояние ензимът GAD65 става най-често атакуваната мишена от автореактивните лимфоцити. (Ludvigsson, Krisky et al. 2012) Все още не е изяснена функцията на GAD65 в панкреатичните бета-клетки, но учените предполагат, че продукта от дейността му, GABA, служи за регулатор на отделянето на панкреатични хормони или като паракринна сигнална молекула между различни клетки в островите на Лангерханс. (Shi, Kanaani et al. 2000) В различни изследвания GABA е считана за активатор или инхибитор на инсулиновата секреция. (Michalik and Erecińska 1992, Satin and Kinard 1998) Структурният анализ на ензима очертава няколко функционално-важни повърхностни

епитопа, което навежда на мисълта, че GAD65 може да допринася за активирането Т- и Б-клетките и за развитието на автоимунното състояние. (Capitani, De Biase et al. 2005)

Част 1 – Хуманизирана моделна система

В различни изследвания е доказано, че е възможно потискането на определени, патологични човешки Б-лимфоцити в хуманизирани модели на СЛЕ и алергия към домашен прах. Това е постигнато с помощта на химерни молекули, които омрежват блокиращия рецептор CD35 с имуноглобулинови рецептори. Първата химерна молекула е създадена чрез свързване на двДНК-имитиращ пептид към мише анти-човешко CD35 моноклонално антитяло. Внасянето на химерата в хуманизирани SCID мишки, трансферирани с PBMC от пациенти със СЛЕ води до потискане на IgG анти-ДНК антитяло-продуциращите плазматични клетки, намаляване нивата на протеинурия и на отлаганията на човешки IgG имунни комплекси в бъбречните гломерули на мишките. (Kerekov, Mihaylova et al. 2011) Втората химерна молекула съдържа копия на пептидна последователност (p52-71) от Der p1, част от *Dermatophagoides pteronyssinus*, свързани със същото анти-човешко CD35 антитяло. Доказано е, че Der p1-пептид химерната молекула омрежва Der p1-специфичен BCR със CD35 на повърхността на алерген-специфични Б-клетки в пациенти с алергия към домашен прах. В резултат значително намалява броят на анти-Dpt IgE антитяло-продуциращите плазматични клетки в хуманизираната моделна система на алергия към домашен прах. (Kerekov, Michova et al. 2014)

В настоящата дисертация изследваме възможността да потиснем GAD65-специфични лимфоцити, свързани с развитието на диабет тип 1. Смятаме, че това е възможно, като използваме протеинови химерни молекули, които се състоят от специфични пептидни епитопи от GAD65 свързани за моноклонално антитяло, специфично за човешки CD35 рецептор. Самият подход на блокиране на Б-клетките е рисков, поради повишената реактивоспособност на някои от тях, лимфопения и абнормалност във физиологията им при

автоимунни заболявания като СЛЕ (Fan, Liu et al. 2014) и автоимунен диабет тип 1 (Hanley, Sutter et al. 2017). Интересен феномен са фенотипните различия между периферните Б-клетки в пациенти с диабет тип 1 и здрави донори. Пациентите имат на повърхността на Б-клетките си по-малко на брой активационни маркери и, като цяло, по-малко зрели Б-клетки от различен клас, сравнено със здравите индивиди от контролните групи. (Hinman, Smith et al. 2014, Hanley, Sutter et al. 2017) Според някои автори, Б-клетъчното зреене в периферията е нарушено в до 50% от пациентите в дългосрочно диабетно състояние, което е възможно да бъде причината за повишените нива на апотоза в нетретираните Б-клетки от пациенти с диабет тип 1, сравнено със здравите донори. Подобни високи нива на апотоза са открити в клетки от периферна кръв на NOD мишки, които развиват спонтанно диабет тип 1. (Badr, Moustafa et al. 2015)

Получените химерни молекули са способни да омрежат повърхностните имуноглобулинови рецептори върху GAD65-специфични Б-клетки с блокиращия рецептор CD35 и като резултат, в клетката е предаван мощен блокиращ сигнал. Генерирането на възможни епитопи *in silico* предостави избирателен подход към потискането на малкото на брой GAD65-специфични Б-лимфоцити, без да повлияе на цялата Б-клетъчна популация. Тази селективност отсъства при масовите терапии на заболяването. По-високият авидитет при разпознаването на комбинацията от повърхностни молекули-мишени (GAD65-специфичен BCR и CD35 рецептор) може да бъде очакван от химерните молекули, и като следствие може да бъде наблюдавано преимущественото свързване на GAD65-специфични клетки, провокирано от ефикасно свързване между рецепторите. И двете GAD65-пептид специфични химери се свързват преференциално към CD19+ Б-клетки изолирани от пациенти или здрави донори, но потискането на свързването на CD35-FITC анти тялото (изразено като % свързани клетки) беше по-видимо, когато мишени бяха Б-клетки от PBMC на пациенти.

Това беше потвърдено при експеримент за разпознаване на епитопи от GAD65 от автоантитела в серуми на пациенти, сравнено със серуми от здрави донори. Независимо, че здравите донори бяха без клинични прояви на диабет в техните серуми има антитела, които разпознават пептидният компонент на двете химерни молекули. Възможно е това да е следствие от множеството фактори, считани за основни при развитието на диабет тип 1 или компонент от активността на естествени антитела. Фактът, че пептидите от контролните химери не са разпознавани от антитела засилва това предположение.

Съвместното култивиране на PBMC от пациенти с диабет тип 1 или здрави донори с GAD65 chimera 1 и 2 имаше значителен ефект върху нивата на апоптоза (клетки положителни по annexin V и PI) и предполага специфично въздействие върху Б-клетките на пациенти, докато Б-клетките на здравите донори не бяха засегнати. Химерите не повлияха активността на Т-лимфоцитите по отношение на пролиферация, но повишиха процента на апоптиралите CD3⁺ клетки, изолирани от пациенти и здрави донори. Можем да обясним ефекта на химерите върху Т-клетките с ограниченото антигенно представяне от страна на блокираните Б-клетки. Равнищата на апоптоза в Т-клетъчната популация при здрави донори може да бъде обяснено с неспецифично свързване на антитялото срещу CD35, което използваме при конструирането на химерите, по време на *in vitro* култирането.

При хуманизирането на NSG животни и изследването на CD45⁺ популацията 30 дни след трансфера открихме различно разпределение на човешките клетки в различни части от перитонеума на мишките. Анализът с проточен цитометър на слезки, лимфни възли, които дренират панкреаса и перитонеуми на опитни животни показва, че нишата, която Б-клетките заемат след хуманизирането е въпросният лимфен възел, докато Т-клетките се ориентират основно в самия перитонеум и в слезката. При животни третирани с химери се наблюдава намаляване на общия брой Б-клетки в рамките на лимфния възел, докато при Т-клетките подобно намаляване не

беше отчетено. Прави впечатление промененото съотношение CD4⁺/CD8⁺ клетки в рамките на лимфния възел при животно третирано с комбинация от химерни молекули и сравнено с нетретирано животно хуманизирано със същите клетки. Можем да допуснем, че действието на химерите е в основата на този феномен. Необходими са още изследвания, за да бъде установена природата на CD4⁺ клетките в рамките на лимфния възел.

Резултатите от изработените микроскопски препарати на панкреасите не доказват явно въздействие на химерите върху Б-клетки. Можем да предположим, че инфилтратите върху островите на Лангерханс са основно от Т-клетки, тъй като при пациенти в напреднала степен на диабет тези клетки са с основна роля. Имунохистохимичен и имунофлуоресцентен анализ биха потвърдили или отхвърлили това предположение.

Представените в рамките на хуманизирана моделна система химерни молекули GAD65 chimera 1 и GAD65 chimera 2 повлияват активността на Б- и Т-лимфоцити, свързани с развитието на автоимунен диабет по различни начини – чрез предотвратяване на диференцирането на Б-клетките до плазматични клетки, чрез потискане на антигенното представяне от страна на GAD65-специфични Б-клетки или чрез нарушаване/ограничаване на общуването между Б- и Т-клетките. Всъщност, когато PBMC от пациенти с диабет тип 1 бяха изложени на действието на GAD65 chimera 1 и 2, беше намален броят на IgG анти-GAD65 антитяло продуциращи плазматични клетки, но не беше потисната цялостната клетъчна пролиферация. В *in vitro* условия анти-CD35 антитялото може да се свърже с различни мишени, които експресират CD35 на повърхността си. Частта от химерите, съдържаща анти-CD35 антитяло, което не се е свързало за мишената си, както и неконюгираните анти-CD35 антитела се свързват към различни групи клетки, които имат на повърхността си CD35. Това би могло да обясни незначителните изменения, наблюдавани при инкубиране на PBMC от пациенти или здрави донори с химерите, които съдържат анти-CD35 антитяло или неконюгирано анти-CD35 антитяло. Ниската концентрация, при

която прилагаме химерните молекули, не позволява неспецифично блокиране на цялостната клетъчна пролиферация, което е подкрепено от МТТ анализа. Като ползотворен ефект можем да изтъкнем, че както GAD65 химерите, така и контролната химера не доведоха до неспецифично потискане на лимфоцитните популации. Резултатите от ELISpot анализа показаха, че насоченото свързване на химерите към GAD65-специфични Б-клетки повлиява активността им, докато активността на Б-клетки изолирани от здрави донори не беше повлияна.

Резултатите *in vitro* бяха потвърдени в *in vivo* експериментите, при които имаше значително намаляване на броя на Б-клетките, които бяха открити при анализа с проточен цитометър, независимо от малкия брой на изследвани пациенти и здрави донори.

Представените в тази част от дисертацията химерни молекули, които включват в себе си два епитопа от GAD65, не могат да повлияят пълния спектър автореактивни лимфоцити в хода на развитието на диабет тип 1. Това е причината тяхното действие да бъде ограничено до избирателно потискане на определени Б-клетки, специфични към съответните епитопи. При подробно изследване на всички възможни епитопи, част от GAD65 е възможно да бъдат конструирани химерни молекули, които съдържат множество пептиди, които да се свържат с по-голям брой Б-клетки.

Част 2 – Миша моделна система

Лигандите за Fc рецептори могат да бъдат много разнообразни. Част от тях, характерни за мишите Fc рецептори, са секреторни антитела (лиганди за FcαR, FcγR, FcεR) или вътреклетъчни имуноглобулини (FcRn и TRIM21). (Rhodes and Isenberg 2017) Въз основа на общия ефект на взаимодействието, FcR семейството може да бъде разделено на няколко категории – активиращи, блокиращи и транспортни Fc рецептори. (Bruhns and Jönsson 2015) Fcγ рецепторите разпознават различни субкласове IgG молекули и могат да бъдат разделени на 4 групи

– FcγRI, FcγRIIb, FcγRIII и FcγRIV. Повечето Fcγ рецептори са отговорни за активирането на клетките и за секрецията на цитокини и осигуряват стимули за пролиферация, когато са повлиявани от комплекси антиген-антитяло. Противоположно е действието на FcγRIIb на повърхността на Б-лимфоцитите, който провежда блокиращ сигнал в клетката. (Nimmerjahn and Ravetch 2008) FcγRIIb е считан за рецептор, който може да бъде открит върху макрофаги, фоликул-дендритни клетки и Б-клетки, независимо че има данни, че е откриван и върху Т-клетки (Qin, Wu et al. 2000, Starbeck-Miller, Badovinac et al. 2014). Потискане чрез него е възможно да повлияе не само на активността на една клетка, а и на околните клетки, посредством разнообразни междуклетъчни механизми на взаимодействие. (Sohn, Pierce et al. 2008, van Montfoort, 't Hoen et al. 2012)

Моделът на индуциран диабет посредством инжектиране със STZ в интактни мишки предизвиква множество симптоми на заболяването в опитните животни. Възможността за прилагане на различни схеми при третиране със STZ позволи да използваме комбинация от класически многостъпален подход на въвеждане и еднократен стимул. Схемата на стимулиране на мишките позволи те да развият диабет много по-бързо (след една седмица) отколкото при стандартния протокол (след около 5-7 седмици). Втората доза не доведе до рязко влошаване на състоянието и животните демонстрираха автоимунни симптоми, основани на повишена авто-реактивност на Б- и Т-клетки, а не на некроза на тъкани.

Във втората част от дисертацията беше изследвана възможността за блокиране на авто-реактивни Б-клетки в миши модел на диабет тип 1, посредством бифункционални белтъчни химерни молекули, които осигуряват едновременно свързване на BCR и миши FcγRIIb. Това омрежване води до потискане на активността на специализирани Б-клетки и предотвратява диференцирането им до антитяло-продуциращи плазмоцити. Окуражаващите резултати от хуманизираната моделна система позволиха разработването на сходни по

структура химерни молекули, които съдържат епитопни пептиди от GAD65 и анти-мише FcγRIIb антителя.

Броят на потенциално захванатите пептиди от GAD65 (с маса около 2 400 Da) е между 14 и 16 копия за всяка имуноглобулинова молекула. Това е определено посредством анализ на мас-спектрометър на подобни химери (съдържащи пептиди и антитела) конструирани по сходен механизъм. (Mihaylova, Voynova et al. 2009) В хода на химичното свързване, съществуващи карбоксилни групи на повърхността на антитялото е възможно да взаимодействат с H₂N- групите на Ahx линкерния участък, намиращ се в С-края на синтетичните пептиди. Някои от карбоксилните групи са разположени в антиген-свързващия участък на антитялото и могат да дадат отражение на потенциалния афинитет на неговото свързване, което би създавало проблем за свързването към съответните антигени. Подобен нежелан феномен не беше наблюдаван.

Общият авидитет на свързване на двойно-специфичните молекули зависи от сбора на афинитетите на отделните части в конструираните молекули, броя на местата за свързване и от структурни изменения в самите молекули. В този случай, авидитетът на свързване очаквано беше по-висок от афинитета на свързването между GAD65-специфичните Б-клетки и епитопите от GAD65, от една страна, и свързването между 2.4G2 антитялото и FcγIIb, от друга страна. Дори и отделните стойности да са ниски, общият авидитет би бил значителен и биологично значим. При *in vivo* прилагане предпочитаните мишени за новополучените белтъчни молекули биха били GAD65-специфични Б-лимфоцити. Независимо от това, някои GAD65-специфични химерни молекули могат да се захванат за клетки, които не са мишени, но имат на повърхността си FcγRIIb. Това захващане, обаче, е минимално и не се отразява на цялостното действие на химерите.

In silico генерираните пептидни епитопи бяха успешно разпознати от анти-GAD65 BCR репертоарът на заболялите животни. Посредством конкурентен FACS анализ между химерите и FITC-свързано анти-FcγRIIb антителя доказахме, че

в хода на конструирането на молекулите способността на антиядловия елемент на химерите да свързва антигени не е променена. Химерните молекули успешно конкурират FITC-конюгираното антияло на база по-високият авидитет, който притежават сравнено с неконюгираното, нативно антияло.

В предишни изследвания на различни миши модели на автоимунни заболявания беше доказано, че третиране с подобни химерни молекули в мишки води до развитието на анти-плъши антители, специфични срещу химерите, когато третирането продължава над 6 седмици. (Tchorbanov, Voynova et al. 2007) Това беше ограничаващ фактор при терапевтичното прилагане на GAD65-специфичните химерни молекули в мишките, стимулирани със STZ. Терапията на животните в посочения диапазон (6 седмици) позволи да бъдат блокирани плазматичните Б-клетки, специфични срещу GAD65 без да бъде генериран цялостен имунен отговор срещу белтъчните химери.

Намаляването на броя на Б-клетките в един организъм може да бъде следствие от различни механизми, един от който е анергия, последвана от апоптоза. Специфичността на химерите им позволява да свързват определени автореактивни клетки, без това да се отрази на общия процент апоптирали клетки. Подобни резултати са получени и при използването на епитоп-специфични протеинови молекули в миши модели на лупус и алергия към домашен прах. (Tchorbanov, Voynova et al. 2007, Kerekov, Michova et al. 2014)

Когато броят автореактивни клетки, върху които въздействат генерираните химерни молекули е малък, намалява и шансът за явен положителен ефект върху тъканите и органите на опитните животни. Прогресирането на заболяването е свързано с генериране на множество специфичности спрямо различни автоантигени. Освен това, Б-клетъчната активност е свързвана с началните етапи от развитието на диабет тип 1. На по-късен етап количеството на Б-клетките намалява за сметка на повечето Т-клетки, които атакуват панкреасите на болните животни и разрушават структурата им - феномен, който е изразен в изработените микроскопски препарати. Необходим е

допълнителен имунохистохимичен и имунофлуоресцентен анализ за да бъде потвърдено по-голямото количество Т-клетки в областта на островите на Лангерханс.

В настоящата дисертация е изследван подход за специфично потискане на Б-лимфоцити в хуманизирана и миша моделна система на диабет тип 1 посредством различни химерни молекули. В рамките на направените тестове е демонстриран потискащият ефект от *in vitro* и *in vivo* третирането на автореактивни Б-клетки от пациенти и експериментални животни. Самото терапевтично прилагане на химерите не е достатъчно, за да попречи на прогресията на заболяването, но позволява да бъде използван още един механизъм за повлияване на терапията при автоимунен диабет.

VI. Изводи

Част 1.

1. EpiDOCK – сървърът за *in silico* определяне на епитопи предсказва епитопи, които са разпознаваеми от автореактивни клетки в пациенти с диабет тип 1.
2. Конструираните химерни молекули GAD65chimera 1 и GAD65 chimera 2 запазват своята антиген-свързваща активност и могат да бъдат използвани за доставяне на пептидни антигени към специфичните Б-клетки.
3. Чрез конструираните химерни молекули е възможно директно повлияване на анти-GAD65 IgG секретиралите плазматични клетки.
4. GAD65 chimera 1 и GAD65 chimera 2 ограничават диференциацията на антиген специфични Б-лимфоцити и повишават нивата на апоптоза на човешки Б-лимфоцити *in vitro*.
5. Трансферът на лимфоцити от пациенти с диабет тип 1 в здрави NSG мишки не може да доведе до пълно възпроизвеждане на човешки симптоми на заболяването в експерименталните животни.
6. След трансфера на PBMC в NSG мишки и третиране с комбинация от GAD65 chimera 1 и GAD65 chimera 2 броят на човешките Б-лимфоцити, изолирани от мишката намалява, а съотношението CD4+/CD8+ се променя значително в дрениращия панкреаса лимфен възел на мишките, инжектирани с клетки от диабетен пациент.

Част 2.

1. Епитопите, предсказани от EpiDOCK в човешкия модел на диабет тип 1 са епитопи, разпознавани от автореактивни клетки и в мишия модел на заболяването.
2. Конструираните химерни молекули mouse GAD65chimera 1 и GAD65 chimera 2 запазват своята антиген-свързваща активност и могат да бъдат

използвани за доставяне на пептидни антигени към специфичните Б-клетки.

3. Беше използван вариант на STZ-индуциран модел на диабет при мишки,. Използваната разновидност на метода, позволи животните да развият по-бързо автоимунни симптоми.
4. Чрез конструирания химерни молекули е възможно директно повлияване на анти-GAD65 IgG секретиращите плазматични клетки в миши модел на диабет тип 1.
5. Mouse GAD65 chimera 1 и mouse GAD65 chimera 2 ограничават диференциацията на антиген специфични Б-лимфоцити и повишават нивата на апоптоза на Б-лимфоцити изолирани от животни с диабет *in vitro*.

VII. Приноси

1. С помощта на EpiDOCK бяха установени 2 епитопа от GAD65, за които не беше известно до този момент, че са разпознавани от DQ8, DRB1*04:01 и DRB1*04:05. Епитопите доказаха своята имуногенност в конструираните молекули.
2. Беше успешно конструиран прототип на протеинови химерни молекули в хуманизиран модел на автоимунен диабет тип 1.
3. Беше доказана способността на генерираните прототипи да взаимодействат с човешки клетки в хуманизирана моделна система и да променят качествения състав на клетките.
4. Успешно бяха конструирани протеинови химерни молекули, които да бъдат използвани в различни миши модели на автоимунен диабет.

VIII. Публикации и участия в научни прояви

Публикации във връзка с дисертационния труд:

1. **Manoylov IK**, Boneva GV, Doytchinova IA, Mihaylova NM, Tchorbantov AI. Protein-engineered molecules carrying GAD65 epitopes and targeting CD35 selectively down-modulate disease-associated human B lymphocytes. **Clin Exp Immunol**. 2019 Sep;197(3):329-340. **Q1, IF 3.409**
2. **Manoylov IK**, Boneva GV, Doytchinova IA, Mihaylova NM, Tchorbantov AI. Suppression of Disease-Associated B Lymphocytes by GAD65 Epitope-Carrying Protein-Engineered Molecules in a Streptozotocin-Induced Mouse Model of Diabetes. **Monoclon Antib Immunodiagn Immunother**. 2019 Oct;38(5):201-208. **Q3, IF 1.38**

Награди:

- 2016** Награда за най-добър доклад, изнесен на The 3rd Black Sea International Immunology School (3rdBSIIS), в Луковит, България (2016-10-14/16)

Участия в научни прояви във връзка с дисертационния труд:

1. **Iliyan Konstantinov Manoylov**, Gabriela Valentinova Boneva, Nikolina Mihaylova Mihaylova, Irini Atanas Doytchinova, Andrey Ivanov Tchorbantov **“Down-modulation of autoreactive B-cells by protein-engineered chimeric molecules in mouse model of Type 1 Diabetes”** като доклад на 5-ти Национален Конгрес по Имунология, в Пловдив, България (2018-10– 25/28)
2. **Iliyan Manoylov**, Gabriela Boneva, Irini Doytchinova, Nikolina Mihaylova, Andrey Tchorbantov **„Protein-engineered molecules carrying GAD65 epitopes and targeting CR1 selectively downmodulate disease-associated human B lymphocytes“** като доклад на 5-ти Национален Конгрес по Имунология, в Пловдив, България (2018-10– 25/28)
3. **I. Manoylov**, G. Boneva, N. Mihaylova, I. Doytchinova, A. Tchorbantov **“Down-modulation of autoreactive B-cells by protein-engineered chimeric molecules in mouse model of Type 1 Diabetes”** като постерно представяне на the 5th European Congress of Immunology 2018 (ECI 2018), в Амстердам, Холандия (2018-09-02/05)
4. **I. Manoylov**, G. Boneva, I. Doytchinova, N. Mihaylova, A. Tchorbantov **“Protein-engineered molecules carrying GAD65 epitopes and targeting CR1 selectively down-modulate disease-associated human B lymphocytes”** като постерно представяне на

- the 5th European Congress of Immunology 2018 (ECI 2018), в Амстердам, Холандия (2018-09-02/05)
5. Andrey Tchobanov, **Iliyan Manoylov**, Nikolina Mihaylova **“A protein-engineered molecules carrying GAD65 epitopes and targeting CR1 selectively down-modulates disease-associated human B lymphocytes.”** като постерно представяне на 11th International Congress on Autoimmunity, в Лисабон, Португалия (2018-05-16/20)
 6. **Iliyan Manoylov**, Gabriela Boneva, Nikolina Mihaylova, Andrey Tchobanov **“Selective alteration of autoreactive B cells by chimeric molecules in a murine model of Autoimmune Diabetes”** като доклад на The 4th Black Sea International Immunology School (BSIIS2017), в Старосел, България (2017-10-20/22)
 7. Габриела Бонева, **Илиян Манойлов**, Николина Михайлова, Ирини Дойчинова, Андрей Чорбанов **“Установяване на нови стратегии за лечение на диабет тип 1 чрез химерни антитела в спонтанен и индуциран миши модел”** като доклад на XII Национална конференция по медицинска биология, Цигов чарк, България (2017–09-08/10)
 8. Gabriela Valentinova Boneva, **Iliyan Konstantinov Manoylov**, Nikolina Mihaylova Mihaylova, Irini A. Doytchinova, Andrey Ivanov Tchobanov **“Construction of chimaeric molecules for modulation of b-CELL activity in mouse model of type 1 diabetes”**, като постерно представяне на Юбилейната Научна Конференция „10 години Българска Асоциация по Клинична Имунология”, в София, България (2016-10-28/29)
 9. **Iliyan Konstantinov Manoylov**, Gabriela Valentinova Boneva, Nikolina Mihaylova Mihaylova, Irini A. Doytchinova, Andrey Ivanov Tchobanov. **“Selective alteration of autoreactive B and T cells by chimeric molecules in a humanized murine model of autoimmune Diabetes”** като доклад на Юбилейната Научна Конференция „10 години Българска Асоциация по Клинична Имунология”, в София, България (2016-10-28/29)
 10. **Manoylov, I.**, Boneva, G., Mihaylova, N., Tchobanov, A. **“Selective alteration of autoreactive B and T cells by chimeric molecules in a humanized murine model of autoimmune Diabetes”** като доклад на The 3rd Black Sea International Immunology School (3rdBSIIS), в Луковит, България (2016-10-14/16)
 11. Gabriela Boneva, **Iliyan Manoylov**, Nikolina Mihaylova, Irini Doytchinova, Andrey Tchobanov **“Selective silencing of autoreactive B lymphocytes using chimaeric molecules in a mouse model of Type 1 Diabetes (T1D)”** като постерно представяне на

- 8th South East European Immunology School (SEEIS 2016), в Дупас, Албания(2016–10–14/17)
12. **Manoylov, I., Boneva, G., Mihaylova, N., Tchorbanov, A. "Selective alteration of autoreactive B and T cells by chimeric molecules in a humanized murine model of autoimmune Diabetes"** като доклад на International Congress of Immunology 2016 (ICI2016), в Мелбърн, Австралия (2016-08-21/26)
 13. Gabriela Boneva, **Iliyan Manoylov, Andrey Tchorbanov "Selective alteration of aself-reactive B and T cells by chimaeric molecules in a humanized mouse model of Type 1 Diabetes (T1D)"** като доклад The 6th Workshop On Experimental Models and Methods In Biomedical Research, в София, България (2016-05-16/18)
 14. Boneva, G., **Manoylov, I., Tchorbanov, A. "Selective silencing of GAD65-specific B Lymphocytes delays disease activity in mice with STZ-induced T1D."** като доклад на Десета работна среща „Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти“, в София, България (2015-11-17/19)
 15. **I. Manoylov, N. Delcheva, I. Atanassova, A. Tchorbanov „Selective suppression of autoreactive B and T cells by chimeric molecules in a humanized mouse model of Autoimmune Diabetes“** като доклад на the 4th European Congress of Immunology 2015 (ECI2015), във Виена, Австрия (2015-09-06/09)
 16. **Илиян Манойлов, Нели Делчева, Илияна Атанасова, Андрей Чорбанов "Потискане на авто-реактивни В и Т клетки чрез протеинови химерни молекули в хуманизиран модел на автоимунен диабет"** като доклад на XI Национална конференция по медицинска биология, в Пловдив, България (2015-05-15/17)
 17. **Iliyan Manoylov, Nelly Delcheva, Iliana Atanassova, Andrey Tchorbanov "Selective suppression of autoreactive B and T cells by chimeric molecules in a humanized mouse model of Autoimmune Diabetes"** като доклад на The 6th Workshop On Expermental Models and Methods In Biomedical Research, в София, България (2015-05-12/14)
 18. **Манойлов, И., Михайлова, Н., Дойчинова, И., Атанасова, И., Чорбанов, А. "Потискане на авто-реактивни В и Т клетки чрез протеинови химерни молекули в хуманизиран модел на автоимунен диабет."** като постерно представяне на Юбилейна Научна Сесия 60 години Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ и 10 години асоцииран с Институт „Пастьор“, в София, България (2015-03-16/17)

