

ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОДОБИЕ ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА И РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА

© В. Ю. Алексеев,¹ О. К. Кабоев,² Е. В. Семенова,² О. Г. Щербакова,³ М. В. Филатов²

¹ Отдел дерматологии и биологии кожных тканей Университета Томаса Джефферсона, Филадельфия, США,

² Отделение Молекулярной и радиационной биофизики Петербургского института ядерной физики им. Б. П. Константинова РАН, Гатчина, Россия,

и ³ Факультет молекулярной и клеточной физиологии Стэнфордского университета, Стэнфорд, США; электронный адрес: filatov@omrb.pnpi.spb.ru

Кардио- и невропатии — наиболее часто встречающиеся осложнения при заболевании дифтерией. В ряде случаев они могут быть следствием противодифтерийной вакцинации. Возможная причина такого рода негативных последствий — наличие перекрестного иммунного ответа между бактериальными иммуногенными детерминантами и жизненно важными тканевыми макромолекулами человека. Поскольку молекулы дифтерийного токсина (ДТ) и рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР-Р) клеток человека могут эффективно взаимодействовать с предшественником гепаринсвязывающего ЭФР-подобного фактора роста и, следовательно, обладают сходными структурными элементами, мы предположили, что антитела против ДТ могут перекрестно реагировать с ЭФР-Р. Для проверки этой гипотезы были использованы сыворотки крови здоровых доноров ($n = 10$) и больных дифтерией пациентов ($n = 15$). Нами обнаружено, что и ДТ, и ЭФР-Р узнаются антителами против ЭФР-Р. С другой стороны, антитела, появляющиеся в крови больных дифтерией пациентов, эффективно взаимодействуют не только с ДТ, но и с внеклеточным доменом ЭФР-Р. При этом высокий уровень таких антител сохраняется в постинфекционный период. Кроме того, сыворотка крови больных дифтерией пациентов ингибирует связывание анти-ЭФР-Р-антител с ЭФР-Р. Усеченная молекула ДТ без В-субъединицы узнается антителами из сыворотки крови больных дифтерией, но не антителами против ЭФР-Р. Таким образом, мы показали, что В-субъединица ДТ и ЭФР-Р обладают сходными антигенными эпитопами. Представляется весьма вероятным, что описанное нами перекрестное антигенное сходство В-субъединицы ДТ с внеклеточным доменом ЭФР-Р приводит у людей, инфицированных *Corynebacterium diphtheriae*, к иммунной атаке как на дифтерийный токсин, так и на собственные ткани организма, вызывая аутоиммунное ингибирование функций ЭФР-Р и являясь причиной постдифтерийных невро- и кардиопатий.

Ключевые слова: дифтерийный токсин, перекрестный иммунный ответ, постдифтерийные осложнения, рецептор эпидермального фактора роста.

Принятые сокращения: ДТ — дифтерийный токсин, ЭФР — эпидермальный фактор роста, ЭФР-Р — рецептор эпидермального фактора роста.

Существуют многочисленные указания на то, что вирусные, бактериальные или паразитические инфекции могут при определенных условиях приводить к аутоиммунным реакциям и даже к развитию аутоиммунных заболеваний, которые продолжают оставаться одной из самых сложных проблем клинической иммунологии (Abu-Shakra, Shoenfeld, 1991; Tomer, Davies, 1993; Miller et al., 2001; Wucherpfennig, 2001; Bach, 2002; Swedo et al., 2004). Более того, причиной аутоиммунных реакций может стать вакцинация против ряда инфекционных агентов. Есть указания на то, что аутоиммунные болезни могут развиваться в течение недель или месяцев после вакцинации (Aron-Maor, Shoenfeld, 2001; Ravel et al., 2004; Rubinstein, 2004; Tishler, Shoenfeld, 2004).

В большинстве случаев аутоиммунная реакция, связанная с вакцинацией, является временной, и эпидемиологические исследования не обнаруживают причинной связи между процедурой вакцинации и возникновением

заболеваний (Chen et al., 2001). Однако уже сегодня Институтом медицины Национальной академии наук США признано причинное соотношение нескольких видов вакцин и аутоиммунных синдромов (Borchers et al., 2002). В частности, отмечена связь вакцинации дифтерийным токсинодом с развитием синдрома Гильена—Барре (Shoenfeld, Aron-Maor, 2000; Donaghy, 2006).

В основе этого феномена может лежать явление молекулярной мимикрии, при котором провоцирующие иммунный ответ молекулярные компоненты инфекционных агентов обладают выраженным антигенным сходством с теми или иными тканевыми макромолекулами. В этих случаях иммунная система хозяина при определенных условиях может узнавать и атаковать собственные антигенные детерминанты, сходные с таковыми инфекционного агента (Bolz, Weis, 2004; D'Elios et al., 2004; Garcia-Vallejo et al., 2005; McClain et al., 2005; Cunha-Neto et al., 2006; McCoy et al., 2006; Swanborg et al., 2006; Waisbren, 2008).

В настоящей работе мы представляем ряд аргументов, указывающих на антигенное сходство В-субъединицы дифтерийного токсина (ДТ) с рецептором эпидермального фактора роста (ЭФР-Р) клеток человека, и высказываем предположение о том, что это сходство может лежать в основе ряда аутоиммунных реакций, имеющих место при заболевании дифтерией и противодифтерийной вакцинации.

Дифтерия — острое инфекционное заболевание, вызываемое *Corynebacterium diphtheriae* и характеризующееся тяжелым течением. Некоторые случаи завершаются летальным исходом. Болеют дифтерией и взрослые, и дети. Главным методом борьбы с дифтерией является иммунизация. Еще несколько лет назад казалось, что дифтерия больше не представляет серьезной опасности для человечества. Однако вспышки этого заболевания в последние 15 лет в государствах бывшего Советского Союза, Эквадоре, Таиланде, Алжире и даже в Европе и США свидетельствуют в пользу обратного (Edmunds et al., 2000; Galazka, 2000; Golaz et al., 2000; Holmes, 2000; Magdei et al., 2000; Popovic et al., 2000; Lumio et al., 2001; Von Graevenitz, 2002; De Benoist et al., 2004; Kolodkina et al., 2006; Dallman et al., 2008). Хорошо известно, что заболевание дифтерией часто сопровождается серьезными нарушениями сердечной деятельности и проблемами в функционировании нервной системы. Эти негативные последствия могут ощущаться в течение весьма длительного периода времени после окончательного подавления инфекции, кроме того, они могут проявиться после противодифтерийной вакцинации (Matisson et al., 1976; Spilkin et al., 1977; Salih et al., 1981; Shoenfeld, Aron-Maor, 2000).

Идея поиска перекрестной иммунологической детерминанты, являющейся возможной причиной такого рода осложнений, основана на факте, что проникновению в клетку ДТ предшествует связывание В-субъединицы его молекулы со специфическим рецептором на поверхности клетки. Было показано, что для проникновения в клетку хозяина в качестве рецептора ДТ может использовать предшественник гепаринсвязывающего ЭФР-подобного фактора роста. С другой стороны, растворимый зрелый гепаринсвязывающий ЭФР-подобный фактор роста служит лигандом для ЭФР-Р (Higashiyama et al., 1991; Naglich et al., 1992; Iwamoto, 1994). Таким образом, и В-субъединица ДТ, и ЭФР-Р способны эффективно взаимодействовать с одной и той же белковой молекулой (гепаринсвязывающим ЭФР-подобным фактором роста). Исходя из этого нами было высказано предположение о том, что молекула ЭФР-Р может иметь антигенные детерминанты, сходные с таковыми В-субъединицы ДТ. Поэтому следует ожидать появления в крови больных дифтерией антител, способных наряду с ДТ связываться с ЭФР-Р, что в конечном итоге должно привести к иммунологической атаке на собственные антигены.

В представленной работе мы протестировали сыворотки крови 15 больных дифтерией на различных стадиях развития заболевания на наличие в них анти-ДТ-антител и установили, что антитела, направленные против В-субъединицы ДТ, эффективно взаимодействуют с ЭФР-Р. Более того, высокий уровень таких антител сохраняется и в постинфекционный период, особенно у пациентов с выраженными признаками неврологических и кардиопатических осложнений. Полученные результаты позволяют предположить, что именно перекрестное

антигенное сходство ДТ и ЭФР-Р может вызывать аутоиммунную реакцию и приводить к таким негативным последствиям.

Материал и методика

В работе использовали клеточную линию эпидермальной карциномы человека А-431 (ATCC, CRL-2592), характеризующуюся повышенным числом ЭФР-Р ($2 \cdot 10^6$ рецепторов ЭФР на 1 клетку) (Sorkin et al., 1988). Клетки А-431 культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Антисыворотки и антитела. Проанализированы сыворотки крови от 10 здоровых доноров и 15 дифтерийных больных. Возраст обследованных пациентов варьировал от 8 до 45 лет. Сыворотки крови получали центрифугированием (1000 g) образцов коагулировавшей крови и хранили в замороженном состоянии при -20°C .

Поликлональные антитела к полипептидной последовательности внеклеточного домена ЭФР-Р были получены в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург). Моноклональные антитела против ЭФР-Р (mAb-108) человека были любезно предоставлены проф. Дж. Шлессинджером (Отдел фармакологии Медицинского центра Университета г. Нью-Йорка, США). В качестве вторичных использовали антитела против иммуноглобулинов G (человека и мыши), конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки А-431 фиксировали 4%-ным раствором формальдегида. После многократного промывания фосфатным буфером, содержащим альбумин (3 %), клетки инкубировали с антисыворотками. Образовавшиеся иммунные комплексы выявляли с помощью меченых AlexaFluor⁴⁸⁸ антител против иммуноглобулинов человека (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Вестерн-блот-анализ. Клетки А-431 лизировали при 0°C в следующем буфере: 20 mM Hepes, pH 7.4, 1 % NP-40, 150 mM NaCl, 20 mM PMSF, по 1 мкг/мл леупептина и апротенина, 20 mM Na_3VO_4 . Белковый электрофорез проводили в денатурирующих условиях (0.1 % SDS) в полиакриламидном геле. После переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану ЭФР-Р и ДТ выявляли с помощью антисывороток здоровых доноров и больных дифтерией или антител к ЭФР-Р. Первые антитела использовали в разбавлении 1 : 1000. Сыворотки крови разбавляли 1 : 100, 1 : 500 или 1 : 1000 в зависимости от экспериментальных задач. Вторые антитела разбавляли в соответствии с инструкциями фирмы-производителя.

Генетическая конструкция для экспрессии белка, содержащего А-субъединицу ДТ. Фрагмент кДНК ДТ, не содержащий В-субъединицы, был получен с помощью ПЦР с использованием следующих праймеров: 5'-ggcgtcatgatgtgtgattc-3' (P1) и 5'-tcgctgacacgattcctgc-3' (P2). В качестве матрицы для ПЦР амплификации использовали геномную ДНК *Corynebacterium diphtheria*. Полученный фрагмент бактериальной ДНК клонировали в вектор pTZ18R (Fermentas, Россия) под контролем промотора *LacZ*. В результате индукции эта генетическая конструкция обеспечивала синтез растворимого белка, имеющего мол. массу около 20 кДа и содержащего А-субъединицу ДТ и фрагмент α -галактозидазы.

Результаты и обсуждение

Имунофлуоресцентный анализ клеток А-431 после их обработки сывороткой крови от больных дифтерией продемонстрировал активное связывание антител сыворотки с клеточной поверхностью. В качестве вторичных использовали антитела против иммуноглобулинов человека, меченные AlexaFluor⁴⁸⁸. Обработка клеток А-431 сывороткой крови здоровых доноров не выявила подобного

эффекта (данные не приводятся). Поскольку известно, что клетки А-431 экспрессируют на своей поверхности значительное количество ЭФР-Р (~2 · 10⁶), было высказано предположение о том, что антитела из сыворотки крови больных дифтерией взаимодействуют с рецепторами ЭФР. Для доказательства этой гипотезы мы проверили взаимодействие ЭФР-Р и анти-ДТ-антител с помощью иммуноблотинга. На рис. 1 представлены результаты такого анализа лизата клеток эпидермальной карциномы че-

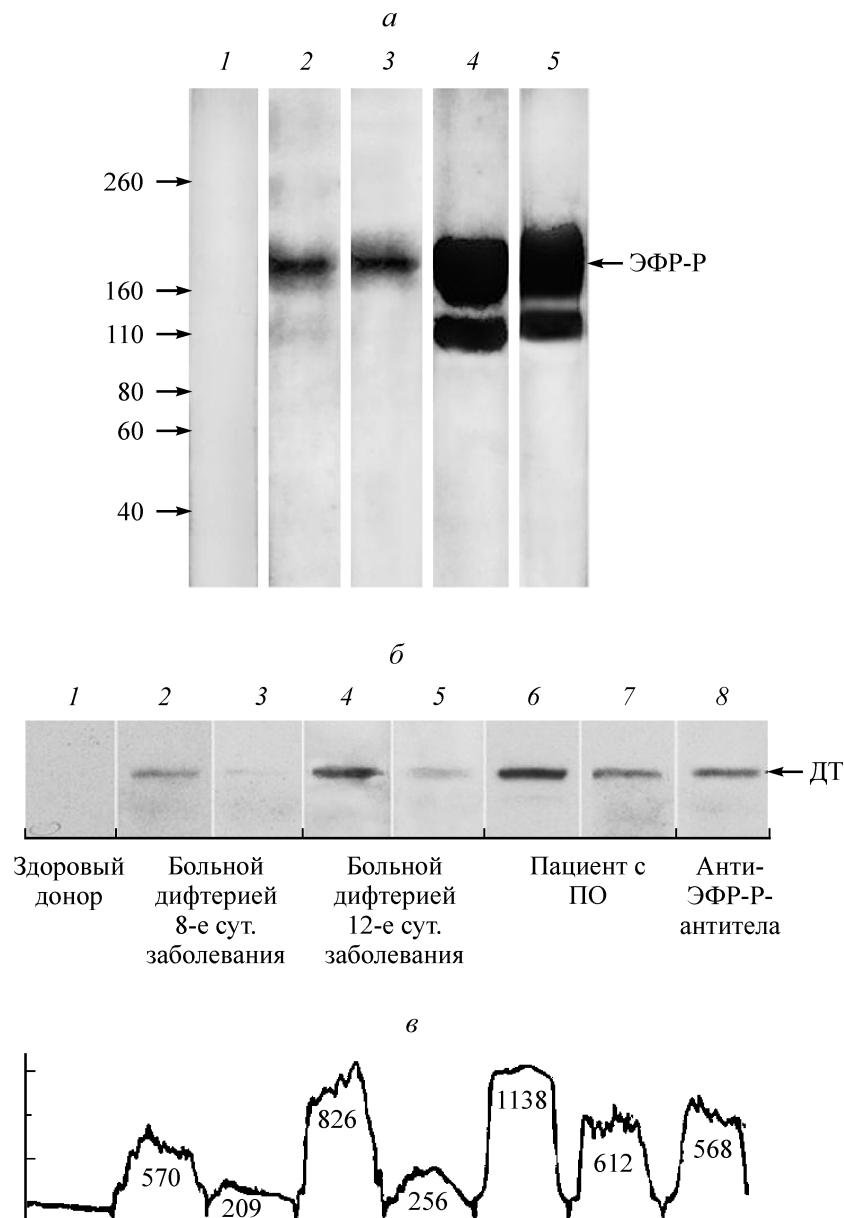


Рис. 1. Взаимодействие антител, появляющихся в крови больных дифтерией, не только с дифтерийным токсином (ДТ), но и с рецептором эпидермального фактора роста (ЭФР-Р).

а — результаты иммуноблотирования лизатов клеток эпидермальной карциномы человека А-431. *Дорожки*: 1 — сыворотка здорового донора, 2 — сыворотка больного дифтерией на 10-е сут, 3 — то же на 20-е сут, 4 — сыворотка пациента с постдифтерийным осложнением, 5 — ЭФР-Р-специфические поликлональные антитела; электрофорез в денатурирующих условиях (0.1 % SDS) в 4%-ном полиакриламидном геле. После переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану ЭФР-Р выявляли с помощью либо антител из сывороток крови различных пациентов, либо поликлональных антител к ЭФР-Р. *б* — полноразмерный ДТ, содержащий субъединицы А и В, выявлен на иммуноблотах с помощью либо антител из сывороток крови различных пациентов, либо поликлональных антител к ЭФР-Р; *дорожки*: 1 — сыворотка здорового донора, 2 и 3 — сыворотка больного дифтерией на 8-е сут при разведениях 1 : 100 и 1 : 1000 соответственно, 4 и 5 — то же на 12-е сут при разведениях 1 : 100 и 1 : 1000 соответственно, 6 и 7 — сыворотка пациента с постдифтерийным осложнением (ПО) при разведениях 1 : 100 и 1 : 1000 соответственно, 8 — ЭФР-Р-специфические поликлональные антитела (разведение 1 : 1000). *Стрелки слева* — маркеры молекулярных масс (кДа), *стрелки справа* — полноразмерный ЭФР-Р и полноразмерный ДТ соответственно. *в* — денситометрия полос Вестерн-блотов, представленных на *б*; *по вертикали* — интенсивность окрашивания соответствующих полос, отн. ед.

ловека А-431. Поликлональные антитела к ЭФР-Р выявляют белок с мол. массой 170 кДа, совпадающей с молекулярной массой зрелого ЭФР-Р. Антитела, появившиеся в крови больных дифтерией, связываются с белком той же молекулярной массы. При этом в крови здоровых доноров не обнаружено антител, взаимодействующих с каким-либо белком из лизата клеток А-431 (рис. 1, а).

В ряде экспериментов с использованием антител к ЭФР-Р наряду с основной полосой выявляются белки меньшей молекулярной массы, которые, по всей видимости, являются продуктами частичного протеолиза нативного белка в лизатах исследуемых клеток. В этом случае и сыворотка крови больных дифтерией регистрирует наличие таких укороченных фрагментов, что служит дополнительным доказательством того, что мы имеем дело с одним и тем же белком.

Поскольку предполагалось сходство антигенных эпитопов ДТ и ЭФР-Р, мы проверили, взаимодействует ли ДТ с поликлональными антителами против внеклеточного домена ЭФР-Р. Как следует из данных рис. 1, ДТ выявляется как сывороткой крови больных дифтерией, так и антителами к ЭФР-Р (рис. 1, б). Денситометрический анализ Вестерн-блотов показал отчетливый рост количества анти-ДТ-антител в крови больных дифтерией по мере развития заболевания, при этом максимальный титр антител был зафиксирован у пациентов с выраженными постдифтерийными осложнениями (рис. 1, в).

Наконец, строгое доказательство того, что антитела, появляющиеся в крови больных дифтерией, взаимодействуют именно с ЭФР-Р, было получено в экспериментах по конкурентному связыванию с использованием антител к ЭФР-Р и сыворотки крови таких пациентов. Предварительная обработка нитроцеллюлозной мембраны при иммуноблотинге сывороткой здоровых доноров не оказывала никакого влияния на связывание анти-ЭФР-Р-антител с ЭФР-Р. Однако обработка блотов сыворотками пациентов с постдифтерийными осложнениями практически полностью блокирует связывание моноклональных антител против ЭФР-Р (рис. 2). Таким образом, полученные результаты позволяют утверждать, что в крови больных дифтерией образуются антитела против ДТ, перекрестно связывающиеся с высокой аффинностью с ЭФР-Р.

Поскольку молекула ДТ состоит из двух функциональных субъединиц (А и В) и именно В ответственна за взаимодействие с гепаринсвязывающим ЭФР-подобным фактором роста (Higashiyama et al., 1991; Naglich et al., 1992; Iwamoto, 1994), мы высказали предположение об иммунологическом сходстве В-субъединицы ДТ и внеклеточного домена ЭФР-Р. Для подтверждения этого мы провели следующий эксперимент. Фрагмент гена ДТ, не содержащий части, кодирующей В-субъединицу, был включен в состав плазмиды рTZ18R под промотором LacZ. Экспрессируемый в клетках *E. coli* белок — усеченный ДТ без В-субъединицы (ΔВ) — связывается с антителами из сыворотки крови больных дифтерией, но не с анти-ЭФР-Р-антителами (рис. 3).

Анализ сывороток крови 15 больных дифтерией показал, что антитела к ЭФР-Р могут быть зарегистрированы в их крови не раньше чем через 7—8 сут после инфицирования, в дальнейшем их титр возрастает, достигая своего максимума по прошествии нескольких недель. Интересно отметить, что у пациентов с выраженными постдифтерийными осложнениями (кардиопатией и нейропатией) высокий уровень анти-ЭФР-Р-антител в крови наблюдался спустя еще более длительное время (рис. 1).

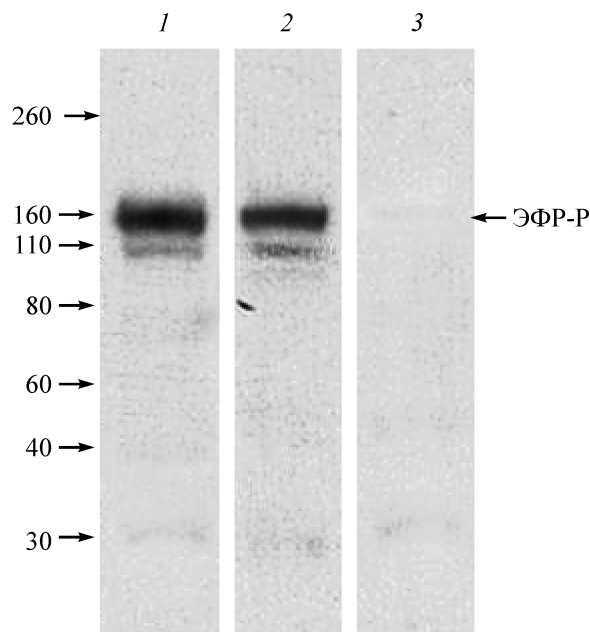


Рис. 2. Результаты эксперимента по конкурентному связыванию с использованием антител, специфичных к ЭФР-Р, и антител из сыворотки крови пациента с постдифтерийным осложнением (ПО).

Дорожки: 1 — после обработки мембраны моноклональными антителами против ЭФР-Р (mAb-108) человека (разведение 1 : 1000), 2 — после предварительной обработки мембраны контрольной сывороткой здорового донора (разведение 1 : 100) и последующей обработки теми же моноклональными антителами (разведение 1 : 1000), 3 — после предварительной обработки мембраны сывороткой пациента с ПО (разведение 1 : 100) и последующей обработки теми же моноклональными антителами (разведение 1 : 1000). Стрелки слева — маркеры молекулярных масс (кДа), стрелка справа — полноразмерный ЭФР-Р (170 кДа). ЭФР-Р визуализирован с помощью Вестерн-блот-анализа.

Таким образом, нами продемонстрировано перекрестное взаимодействие анти-ДТ-антител с ЭФР-Р. Представляется весьма вероятным, что описанное здесь перекрестное антигенное сходство приводит к иммунной атаке как на ДТ, так и на собственные (аутогенные) ткани организма, вызывая острую или хроническую иммунную реакцию.

Перекрестные реакции антител с антигенами различного происхождения могут наблюдаться в следующих трех случаях: 1) если изучаемые антитела обладают случайной полиреактивностью, т. е. способностью взаимодействовать со структурно несхожими антигенами; 2) если молекулы различных белковых антигенов имеют подобные аминокислотные последовательности, формирующие сходные по конфигурации антигенные детерминанты; 3) если пространственно похожие антигенные детерминанты образуются за счет особенностей конформации белковых молекул, не имеющих структурной гомологии.

В рассматриваемом нами случае первое предположение может быть практически исключено, в связи с тем что использовались различные препараты антител — как моноклональных, так и поликлональных. Предположение о случайном узнавании двух несхожих антигенов в этом случае было бы эквивалентно сомнению в возможностях специфического иммунологического узнавания в принципе. Третья возможность также вряд ли может иметь отношение к обнаруженному в этой работе явлению, так как иммунологическое сходство рассматриваемых молекул наблюдалось после электрофореза белков в денатурирующих условиях, разрушающих нативную конформацию.

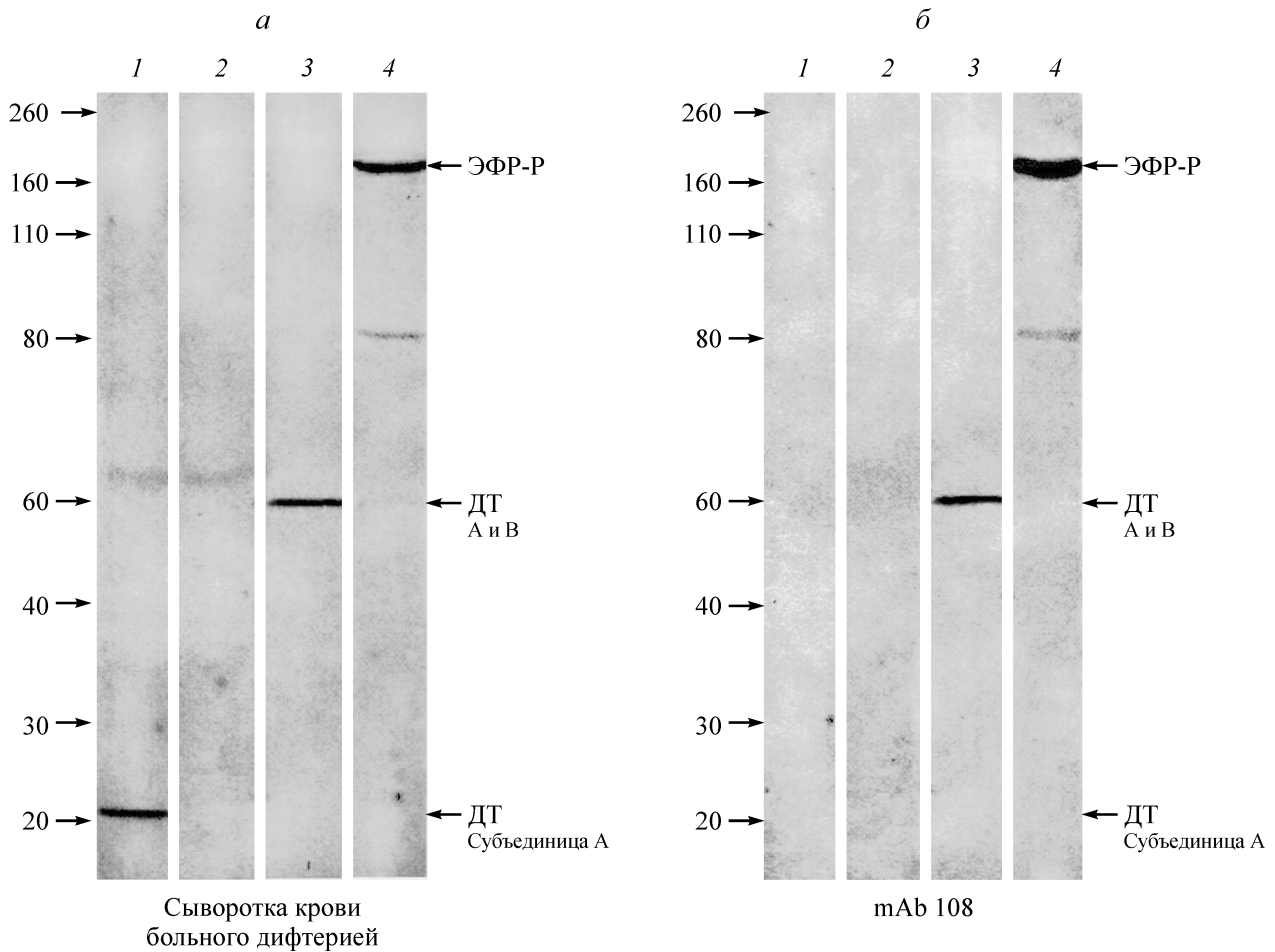


Рис. 3. Взаимодействие А-субъединицы ДТ с антителами из сыворотки крови больных дифтерией и отсутствие такого взаимодействия с анти-ЭФР-Р-антителами.

Представлены результаты иммуноблотирования лизатов клеток *E. coli*, экспрессирующих усеченный (ΔB) ДТ, содержащий А-субъединицу. Белковый электрофорез проводили в градиенте SDS-ПААГ (4—20 %). После переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану А-субъединицу ДТ выявляли с помощью антител из сыворотки крови больного дифтерией (а) или моноклональных антител против ЭФР-Р (mAb-108) (б). Дорожки: 1 — лизат клеток *E. coli*, экспрессирующих А-субъединицу ДТ, 2 — лизат контрольных клеток *E. coli*; 3 — полноразмерный ДТ, 4 — лизат клеток HeLa, экспрессирующих ЭФР-Р. Стрелки слева — маркеры молекулярных масс (кДа), стрелки справа — полноразмерный ЭФР-Р, полноразмерный ДТ и А-субъединица ДТ соответственно.

Анализ первичных аминокислотных последовательностей не обнаруживает протяженных статистически значимых гомологий между молекулами дифтерийного токсина (ДТ, код PDB: 1F0L) и внеклеточного домена рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР-Р, код PDB: 1NQL). Поэтому неудивительно, что и на уровне пространственных структур эти молекулы имеют очень мало общего. Существуют, однако, две короткие гомологичные последовательности длиной в 4 аминокислотных остатка. На рис. 4 представлено сравнение наиболее схо-

жих фрагментов аминокислотных последовательностей В-субъединицы дифтерийного токсина и ЭФР-Р. Анализ пространственной организации этих структур показал, что они располагаются примерно на одинаковом расстоянии друг от друга ($1.9 \cdot 10^{-9}$ — $2.1 \cdot 10^{-9}$ м) и имеют примерно одинаковый уровень поверхности, доступной растворителю (ПДР), равный $288 \cdot 10^{-10}$ и $253 \cdot 10^{-10}$ м² для ДТ и ЭФР-Р соответственно. Более того, расчеты ПДР этих двух белков показали высокий уровень корреляции ($R = 0.82$) между распределениями ПДР по остаткам этих го-

В-субъединица ДТ: 197 LHDGYAVSWNTVEDSIIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVN ---
 ЭФР-Р: 383 ----HTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFS

KSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFRCRPKSPVYVGNVDVHA
 LAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDV IISGNKNLICYANTINWK

Рис. 4. Сравнение наиболее схожих аминокислотных последовательностей В-субъединицы дифтерийного токсина и рецептора эпидермального фактора роста.

Подчеркиванием выделены идентичные или сходные по свойствам аминокислоты.

мологических аминокислотных последовательностей. Расчеты производили с помощью точного аналитического метода расчета поверхности белков, доступной растворителю, и компьютерной программы GETAREA, любезно предоставленной авторами (Fraczkiewicz, Braun, 1998). Параметры базисных типов атомов белка и молекул воды были взяты из литературы (Wesson, Eisenberg, 1992). Все это позволяет предположить, что именно эти элементы структуры ДТ и ЭФР-Р могли бы являться сайтами перекрестного связывания антител.

Известно, что ЭФР-Р относится к семейству рецепторных тирозинкиназ — важных регуляторов клеточной пролиферации и злокачественной трансформации. Принципиальная особенность членов этого семейства — трансмембранная локализация и необходимость взаимодействия с соответствующим полипептидным лигандом для реализации киназной активности. С учетом высокой структурной гомологии лигандсвязывающих доменов ЭФР-Р и других членов семейства рецепторных тирозинкиназ (Erb2, Erb3 и Erb4) (Lemmon, 2009) не исключено, что анти-ДТ-антитела могут перекрестно связываться не только с ЭФР-Р, но и с другими членами этого семейства белков, блокируя их функции. Поскольку кардиомиопатии и невропатии могут возникать вследствие нарушений в функционировании рецепторных тирозинкиназ (Eiraku et al., 2002; Garratt et al., 2003; Shah et al., 2006; Malone, 2007; Rajagopalan et al., 2008), возможно, что появление в крови больных дифтерией пациентов анти-ДТ-антител и является причиной различных постинфекционных осложнений.

Исходя из всего вышесказанного напрашиваются два вывода, имеющих практическое значение. Во-первых, профилактическая противодифтерийная вакцинация может вызывать серьезные осложнения из-за описанного нами перекрестного иммунного ответа. Во избежание таких нежелательных эффектов предлагается вакцинация токсином, не содержащим В-субъединицы и, следовательно, не имеющим перекрестной иммунной детерминанты с ЭФР-Р клеток человека. Во-вторых, лечение дифтерии связано с использованием антисыворотки. Применение больших доз антисыворотки также может приводить к патологическим последствиям, причина которых, по нашему мнению, кроется в наличии в антисыворотке антител, перекрестно реагирующих с ЭФР-Р. Получение антисыворотки, не содержащей антител к В-субъединице ДТ, позволит использовать заведомо большие дозы антисыворотки и тем самым существенно усилить эффективность терапии. Наконец, в тех случаях, когда имеется взаимодействие типа лиганд—рецептор между молекулами инфицирующего агента и молекулами, продуцируемыми клетками хозяина, возможной мишенью для перекрестной иммунной реакции могут оказаться аутогенные партнеры этих рецепторов. Такой подход может оказаться полезным при изучении иммунологических осложнений, возникающих при различных инфекционных заболеваниях.

Список литературы

Abu-Shakra M., Shoenfeld Y. 1991. Chronic infections and autoimmunity. Immunology series. 55 : 285—313.
 Aron-Maor A., Shoenfeld Y. 2001. Vaccination and systemic lupus erythematosus: the bidirectional dilemmas. Lupus. 10 : 237—240.
 Bach J. F. 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. The New England J. Med. 347 : 911—920.

Bolz D. D., Weis J. J. 2004. Molecular mimicry to *Borrelia burgdorferi*: pathway to autoimmunity? Autoimmunity. 37 : 387—392.
 Borchers A. T., Keen C. L., Shoenfeld Y., Silva J., Jr., Gershwin M. E. 2002. Vaccines, viruses, and voodoo. J. Investig. Allergol Clin. Immunol. 12 : 155—168.
 Chen R. T., Pless R., Destefano F. 2001. Epidemiology of autoimmune reactions induced by vaccination. J. Autoimmunity. 16 : 309—318.
 Cunha-Neto E., Bilate A. M., Hyland K. V., Fonseca S. G., Kalil J., Engman D. M. 2006. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. Autoimmunity. 39 : 41—54.
 Dallman T., Neal S., Green J., Efstratiou A. 2008. Development of an online database for diphtheria molecular epidemiology under the remit of the DIPNET project. Euro Surveill. 13 (19) : 1—2.
 De Benoist A. C., White J. M., Efstratiou A., Kelly C., Mann G., Nazareth B., Irish C. J., Kumar D., Crowcroft N. S. 2004. Imported cutaneous diphtheria, United Kingdom. Emerging Infectious Diseases. 10 : 511—513.
 D'Elis M. M., Appelmelk B. J., Amedei A., Bergman M. P., Del Prete G. 2004. Gastric autoimmunity: the role of *Helicobacter pylori* and molecular mimicry. Trends in Mol. Med. 10 : 316—323.
 Donaghy M. 2006. Neurologists and the threat of bioterrorism. J. Neurol. Sci. 249 : 55—62.
 Edmunds W. J., Pebody R. G., Aggerback H., Baron S., Berbers G., Conyn-van Spaendonck M. A., Hallander H. O., Olander R., Maple P. A., Melker H. E., Olin P., Fievet-Groynne F., Rota C., Salmaso S., Tischer A., von-Hunolstein C., Miller E. 2000. The sero-epidemiology of diphtheria in Western Europe. ESEN Project. European Sero-Epidemiology Network. Epidemiol. Infect. 125 : 113—125.
 Eiraku M., Hirata Y., Takeshima H., Hirano T., Kengaku M. 2002. Delta/notch-like epidermal growth factor (EGF)-related receptor, a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons. J. Biol. Chem. 277 : 25 400—25 407.
 Fraczkiwicz R., Braun W. 1998. Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules. J. Computat. Chem. 19 : 319—333.
 Galazka A. 2000. The changing epidemiology of diphtheria in the vaccine era. J. Infect. Diseases. 181. Suppl. 1 : S2—S9.
 Garcia-Vallejo F., Dominguez M. C., Tamayo O. 2005. Autoimmunity and molecular mimicry in tropical spastic paraparesis/human T-lymphotropic virus-associated myelopathy. Brazilian J. Med. Biol. Res. (Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica). 38 : 241—250.
 Garratt A. N., Ozcelik C., Birchmeier C. 2003. ErbB2 pathways in heart and neural diseases. Trends Cardiovasc. Med. 13 : 80—86.
 Golaz A., Lance-Parker S., Welty T. et al. 2000. Epidemiology of diphtheria in South Dakota. South Dakota J. Med. 53 : 281—285.
 Higashiyama S., Abraham J. A., Miller J., Fiddes J. C., Klagsbrun M. 1991. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. Science. 251 : 936—939.
 Holmes R. K. 2000. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. J. Infect. Diseases. 181 (Suppl. 1) : S156—S167.
 Iwamoto R., Higashiyama S., Mitamura T., Taniguchi N., Klagsbrun M., Mekada E. 1994. Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. EMBO J. 13 : 2322—2330.
 Kolodkina V., Titov L., Sharapa T., Grimont F., Grimont P. A., Efstratiou A. 2006. Molecular epidemiology of *C. diphtheriae* strains during different phases of the diphtheria epidemic in Belarus. BMC Infect. Diseases. 6 : 129—136.
 Lemmon M. A. 2009. Ligand-induced ErbB receptor dimerization. Exp. Cell Res. 315 : 638—648.

- Lumio J., Olander R. M., Groundstroem K., Suomalainen P., Honkanen T., Vuopio-Varkila J. 2001. Epidemiology of three cases of severe diphtheria in Finnish patients with low antitoxin antibody levels. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Diseases.* 20 : 705—710.
- Magdei M., Melnic A., Benes O., Bukova V., Chicu V., Sohot-ski V., Bass A. 2000. Epidemiology and control of diphtheria in the Republic of Moldova, 1946—1996. *J. Infect. Diseases.* 181 (Suppl. 1) : S47—S54.
- Malone P., Miao H., Parker A., Juarez S., Hernandez M. R. 2007. Pressure induces loss of gap junction communication and redistribution of connexin 43 in astrocytes. *Glia.* 55 : 1085—1098.
- Matisonn R. E., Mitha A. S., Chesler E. 1976. Successful electrical pacing for complete heart block complicating diphtheritic myocarditis. *British Heart J.* 38 : 423—426.
- McClain M. T., Heinlen L. D., Dennis G. J., Roebuck J., Harley J. B., James J. A. 2005. Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nature Med.* 11 : 85—89.
- McCoy L., Tsunoda I., Fujinami R. S. 2006. Multiple sclerosis and virus induced immune responses: autoimmunity can be primed by molecular mimicry and augmented by bystander activation. *Autoimmunity.* 39 : 9—19.
- Miller S. D., Katz-Levy Y., Neville K. L., Vanderlugt C. L. 2001. Virus-induced autoimmunity: epitope spreading to myelin autoepitopes in Theiler's virus infection of the central nervous system. *Adv. Virus Res.* 56 : 199—217.
- Naglich J. G., Metherall J. E., Russell D. W., Eidels L. 1992. Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell.* 69 : 1051—1061.
- Popovic T., Mazurova I. K., Efstratiou A., Vuopio-Varkila J., Reeves M. W., De Zoysa A., Glushkevich T., Grimont P. 2000. Molecular epidemiology of diphtheria. *J. Infect. Diseases.* 181 (Suppl. 1) : S168—S177.
- Rajagopalan V., Zucker I. H., Jones J. A., Carlson M., Ma Y. J. 2008. Cardiac ErbB-1/ErbB-2 mutant expression in young adult mice leads to cardiac dysfunction. *Amer. J. Physiol.* 295 : 543—554.
- Ravel G., Christ M., Horand F., Descotes J. 2004. Autoimmunity, environmental exposure and vaccination: is there a link? *Toxicology.* 196 : 211—216.
- Rubinstein E. 2004. Vaccination and autoimmune diseases: the argument against. *Isr. Med. Assoc. J.* 6 : 433—435.
- Salih M. A., Suliman G. I., Hassan H. S. 1981. Complications of diphtheria seen during the 1978 outbreak in Khartoum. *Annals Tropical Pediatrics.* 1 : 97—101.
- Shah B. H., Shah F. B., Catt K. J. 2006. Role of metalloproteinase-dependent EGF receptor activation in alpha-adrenoceptor-stimulated MAP kinase phosphorylation in GT1-7 neurons. *J. Neurochem.* 96 : 520—532.
- Shoenfeld Y., Aron-Maor A. 2000. Vaccination and autoimmunity—«vaccinosis»: a dangerous liaison? *J. Autoimmun.* 14 : 1—10.
- Sorkin A. D., Teslenko L. V., Nikolsky N. N. 1988. The endocytosis of epidermal growth factor in A431 cells: a pH of microenvironment and the dynamics of receptor complex dissociation. *Exp. Cell Res.* 175 : 192—205.
- Spilkin S., Mitha A. S., Matisonn R. E., Chesler E. 1977. Complete heart block in a case of idiopathic hypertrophic subaortic stenosis: noninvasive correlates with the timing of atrial systole. *Circulation.* 55 : 418—422.
- Swanborg R. H., Boros D. L., Whittum-Hudson J. A., Hudson A. P. 2006. Molecular mimicry and horror autotoxicus: do chlamydial infections elicit autoimmunity? *Exp. Rev. Mol. Med.* 8 : 1—23.
- Swedo S. E., Leonard H. L., Rapoport J. L. 2004. The pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection (PANDAS) subgroup: separating fact from fiction. *Pediatrics.* 113 : 907—911.
- Tishler M., Shoenfeld Y. 2004. Vaccination may be associated with autoimmune diseases. *Isr. Med. Assoc. J.* 6 : 430—432.
- Tomer Y., Davies T. F. 1993. Infection, thyroid disease, and autoimmunity. *Endocrine Rev.* 14 : 107—120.
- Von Graevenitz A. 2002. The changing epidemiology of diphtheria in the past two centuries. *Ann. Ig.* 14 (Suppl. 1) : 1—5.
- Waisbren B. A., Sr. 2008. Acquired autoimmunity after viral vaccination is caused by molecular mimicry and antigen complementarity in the presence of an immunologic adjuvant and specific HLA patterns. *Med. Hypotheses.* 70 : 346—348.
- Wesson L., Eisenberg D. 1992. Atomic solvation parameters applied to molecular dynamics of proteins in solution. *Protein Sci.* 1 : 227—235.
- Wucherpfennig K. W. 2001. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J. Clin. Invest.* 108 : 1097—1104.

Поступила 16 XII 2009

IMMUNOLOGICAL SIMILARITY OF DIPHTHERIA TOXIN AND EGF RECEPTOR

V. Yu. Alexeyev,¹ O. K. Kaboev,² O. G. Scherbakova,³ E. V. Semenova,² M. V. Filatov²

¹ Department of Dermatology and Cutaneous Biology, Thomas Jefferson University, Jefferson Vaccine Center, Philadelphia, USA,

² Molecular and Radiation Biophysics Division of St. Petersburg Nuclear Physics Institute RAS, St. Petersburg, Gatchina, Russia,

and ³ Department of Molecular and Cellular Physiology, Stanford University, Stanford, USA; e-mail: filatov@omrb.pnpi.spb.ru

Cardiomyopathy and neuropathy are the two commonly observed complications in diphtheria patients and in, some instances, individuals vaccinated against diphtheria. The nature of these complications remains not well understood. It was suggested that autoimmunity may play a role in the development of these afflictions. Based on functional similarities between diphtheria toxin (DT) and epidermal growth factor receptor (EGFR), which both can bind to the heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) precursors, we suggested that antibodies developed against DT can cross react with EGFR. Here, using serum from healthy donors ($n = 10$) and diphtheria patients ($n = 15$), we demonstrated that B-subunit of DT has the antigenic epitopes similar to those of EGFR. Diphtheria toxin as well as EGFR could be recognized by antibodies raised against EGFR and by serum antibodies from diphtheria patients. Moreover serum of diphtheria patients competitively inhibits binding of anti-EGFR antibodies to the receptor. The truncated diphtheria toxin without B-subunit could be detected by serum antibodies of diphtheria patients, but not by anti-EGFR antibodies. Collectively, these studies demonstrate cross-reactivity of antibodies raised against B-subunit of DT and extracellular domain of EGFR and suggest that clinically observed post-diphtheria complications may result from autoimmune inhibition of EGFR function and possible destruction of receptor-positive tissues.

Key words: diphtheria toxin, epidermal growth factor receptor, cross-immunoreactivity, post-diphtheria complications.