На правах рукописи

БАРАНОВ КОНСТАНТИН ОЛЕГОВИЧ

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ НОВЫХ ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ЧЕЛОВЕКА FCRL1, FCRL4 И FCRL6

03.01.07 – молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2014

Работа выполнена в лаборатории иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Научный руководитель:	**Таранин Александр Владимирович**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск
Официальные оппоненты:	**Рыкова Елена Юрьевна**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск
	Катохин Алексей Вадимович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агенства, г. Москва

Защита состоится «_18_» ___июня___ 2014 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8/2, тел (383)-363-90-45, тел +7-952-916-7858, e-mail: kokoza@mcb.nsc.ru. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН www.mcb.nsc.ru.

Автореферат разослан «____» __апреля__2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук Е. Б. Кокоза

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Инициация, развитие и завершение иммунного ответа против чужеродных организмов у позвоночных определяются балансом разнонаправленных сигналов, получаемых клетками иммунной системы через поверхностные и внутриклеточные рецепторы. Нарушения регуляции иммунного ответа лежат в основе этиологии и патогенеза многих заболеваний, включая хронические инфекционные болезни, аллергические, аутоиммунные реакции, а также злокачественные новообразования. Выяснение роли отдельных рецепторов в сети регуляторных сигналов имеет важнейшее значение для понимания функционирования иммунной системы и создания методов коррекции иммунного ответа при иммунопатологиях (Murphy, 2011).

К настоящему времени у человека описано более десятка семейств иммунорегуляторных рецепторов. Одним из наиболее изученных является семейство лейкоцитарных Fc-рецепторов (FcR), члены которого, взаимодействуя со своими лигандами – константными областями иммуноглобулинов, выполняют ключевые функции в регуляции гуморального и клеточного иммунного ответа (Ravetch and Bolland, 2001).

В лаборатории иммуногенетики параллельно с несколькими зарубежными группами у человека и мыши было обнаружено ранее неизвестное семейство генов, родственных генам *FcR* и экспрессирующихся в клетках иммунной системы (Guselnikov et al., 2002; Mechetina et al., 2002; Chikaev et al., 2005). У человека в состав этого семейства входит 8 генов, шесть из которых кодируют трансмембранные поверхностные белки, получившие по новой номенклатуре (Maltais et al., 2006) наименование FCRL1-FCRL6 (FcR-like 1-6). Внеклеточные области FCRL1-FCRL6 содержат от трёх до девяти иммуноглобулин (ИГ)-подобных доменов, а цитоплазматические участки имеют разные паттерны тирозин-содержащих сигнальных мотивов. Для данного исследования были выбраны три наименее изученных членов семейства FCRL человека: FCRL1, FCRL4 и FCRL6. К моменту начала работы вся имеющаяся о них информация ограничивалась структурой гена и отдельными данными по экспрессии мРНК (Hatzivassiliou et al., 2001; Davis et al., 2002). Характер экспрессии рецепторов FCRL1, FCRL4 и FCRL6 в тканевых и клеточных компартментах, их функция, их лиганды, а также связь с заболеваниями оставались неизвестными.

Цели и задачи исследования. Целью данного исследования являлись характеризация трёх членов FCRL-семейства (FCRL1, FCRL4 и FCRL6) на белковом уровне и изучение их роли в иммунном ответе. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Провести анализ экспрессии мРНК FCRL1 и FCRL4 в клетках и тканях человека в норме и при патологиях крови.
2. Получить моноклональные (МКА) и поликлональные антитела (ПКА) против FCRL1, FCRL4 и FCRL6. Используя полученные антитела, провести анализ экспрессии и биохимических характеристик этих рецепторов.
3. Провести поиск лигандов для рецепторов FCRL1 и FCRL4 методом экспрессионного клонирования.

Научная новизна. В настоящей работе с помощью полученных моноклональных и поликлональных антител впервые охарактеризованы белки нового семейства FCRL человека – FCRL1, FCRL4 и FCRL6. Установлено, что FCRL1 – это белок с молекулярной массой 57 кДа, который экспрессируется исключительно зрелыми CD19+ В-клетками. Показано, что в селезёнке и миндалине человека FCRL1+ клетки сосредоточены в мантии вторичных лимфоидных фолликулов, а в миндалине, кроме того, в зоне лимфоидного эпителия. Установлено, что FCRL4 экспрессируется на поверхности зрелых В-лимфоцитов, локализующихся в экстрафолликулярных областях вторичных лимфоидных органов и образующих небольшую субпопуляцию нециркулирующих лимфоцитов. FCRL6 продуцируется в виде гликопротеина с молекулярной массой 63 кДа на поверхности цитотоксических CD8+ Т-клеток и CD56+ NK-клеток в периферической крови и вторичных лимфоидных органах. Впервые обнаружены достоверные изменения уровня экспрессии гена *FCRL1* при некоторых аутоиммунных и гематологических заболеваниях. Разработан новый метод выявления антител против нативных эпитопов в антисыворотках, полученных при иммунизации рекомбинантными белками и пептидами.

Научно-практическая значимость исследования. Результаты данной работы расширяют фундаментальные знания о лимфоцитах человека, механизмах дифференцировки В- и Т-клеток и управления гуморальным и клеточным иммунитетом. Полученные FCRL1-, FCRL4- и FCRL6-специфичные антитела могут быть использованы в качестве инструмента для дальнейших исследований роли этих рецепторов в иммунной системе, а также могут иметь диагностический потенциал при ряде аутоиммунопатологий. Разработанный метод иммуноанализа может существенно упростить задачу получения моноклональных антител против нативных эпитопов при иммунизации антигенами, наработанными в бактериальных клетках.

Положения, выносимые на защиту. Определение профиля экспрессии гена *FCRL1* в клетках и тканях человека установило

достоверные изменения его уровня при ряде патологий крови. С помощью полученных нами МКА и ПКА впервые определены паттерны экспрессии в тканях человека и биохимические характеристики белков FCRL1, FCRL4 и FCRL6. Потенциальные лиганды для FCRL1 и FCRL4 обнаружены на клетках лимфоидных фолликулов и лимфоэпителия миндалины, соответственно. Для FCRL4 кандидатом на роль такого лиганда является галектин-9.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на: конференциях молодых учёных-грантодержателей биологических институтов СО РАН (Новосибирск, 2001, 2003, 2004), 14-й Международной конференции «Лимфатические ткани и зародышевые центры в иммунных реакциях» (Гронинген, Нидерланды, 2002), EURESCO конференции «В-клетки в норме и при заболеваниях» (Маратея, Италия, 2003), 12-м Международном симпозиуме «Сигналы и сигнальная трансдукция в иммунной системе» (Шопрон, Венгрия, 2003), отчетных сессиях аспирантов Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, 2003, 2005), Объединенном иммунологическом форуме (Екатеринбург, 2004; Санкт-Петербург, 2008), 7-й и 8-й Международной летней школе по иммунологии имени Джона Хемфри (Москва, 2005, 2007), 13-м Международном иммунологическом конгрессе (Рио-де-Жанейро, Бразилия, 2007), 21-й Международной конференции по геному млекопитающих (Киото, Япония, 2007), 4-й конфереции «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, 2008), 9-й Международной конференции «Дифференцировочные антигены лейкоцитов человека» (Барселона, Испания, 2010).

Вклад автора. Основная часть экспериментов была выполнена автором самостоятельно. Получение МКА и ПКА против FCRL4 было сделано совместно с Р.В. Горчаковым. Работа по конъюгированию FCRL-пептидов к белку носителю была проведена под руководством П.П. Лактионова. Бакуловирусный продуцент FCRL6 был получен совместно с Л.В. Мечетиной. Создание кДНК-библиотеки в эукариотическом экспрессирующем векторе проводилось совместно с А.М. Наякшиным.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, а также выводов и списка цитируемой литературы, в котором содержится 161 ссылка. Работа изложена на 163 страницах машинописного текста, содержит 1 таблицу, 43 рисунка.

Публикации. Содержание диссертации должным образом отражено в автореферате и изложено в 17 публикациях: 4 статьях (из них 3

опубликованы в изданиях Перечня ВАК), и 13 публикациях в виде тезисов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе использовали следующие методы: получение моноклональных и поликлональных антител, иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг, иммуноцито- и гистохимический анализ с использованием флуоресцентных и ферментных меток, выделение и очистка плазмидной ДНК, основные методы клонирования ДНК, полимеразная цепная реакция, секвенирование, дот-гибридизация ДНК, создание кДНК-библиотеки и её нормализация, очистка рекомбинатных белков, транзитная и стабильная трансфекция эукариотических клеток. Кроме того, мы использовали биоинформационный подход для анализа кДНК и белковых последовательностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ экспрессии мРНК FCRL1 и FCRL4 в клетках и тканях человека в норме и при патологиях

Для исследования экспрессии гена *FCRL1* в тканях человека в норме и при патологиях использовали метод дот-блот гибридизации на коммерческих мембранах Multiple Tissue Expression Array (Clontech). *FCRL1* экспрессируется преимущественно в органах и тканях иммунной системы: селезёнке, эмбриональной селезёнке, лимфоузлах, костном мозге, лейкоцитах периферической крови и тимусе. Слабая экспрессия *FCRL1* была зарегистрирована также в органах желудочно-кишечного тракта: желудке, среднем отделе тонкой кишки, подвздошной кишке, илеоцекальной зоне кишки, а также в аппендиксе. Экспрессия *FCRL1*, обнаруженная в органах пищеварительной системы, обусловлена, вероятнее всего, лимфоидными клетками, которые, как известно, присутствуют в слизистой оболочке желудка и различных отделах кишечника. Из 8 проанализированных линий клеток, имеющих разное происхождение: HL-60, HeLa, SW480, A549, K-562, MOLT-4, Raji, Daudi – только линия Raji, представляющая собой В-лимфоциты, дала положительный сигнал. Таким образом, полученные нами данные показывают, что у человека ген *FCRL1* экспрессируется преимущественно в органах и тканях иммунной системы, где его экспрессия связана с В-лимфоцитами. При гибридизации этой же мембраны с FCRL4-зондом сигнал не обнаружили, что, по-видимому, обусловлено очень низкой экспрессией *FCRL4*.

Экспрессию гена *FCRL1* при аутоиммунных и гематологических заболеваниях исследовали методом дот-блот гибридизации на мембранах

Autoimmune Disease Profiling Array и Blood Disease Profiling Array, соответственно (рис. 1). Гибридизационный сигнал был обнаружен только в CD19+ В-лимфоцитах, но отсутствовал в CD14+ моноцитах, а также CD3+ Т-лимфоцитах, что подтвердило В-лимфоцитарную природу экспрессии гена *FCRL1*. Попарное сравнение данных, полученных для каждого аутоиммунного заболевания, с данными здоровых индивидуумов, показало, что уровень экспрессии гена *FCRL1* в периферических CD19+ В-лимфоцитах был достоверно выше у больных с рассеянным склерозом, антифосфолипидным синдромом, артериитом Такаясу и болезнью Виллебранда (рис. 1*а*). У больных идиопатической тромбоцитопенией наблюдалась тенденция к достоверному отличию от контрольной группы. У больных системной красной волчанкой и ревматоидным артритом уровень экспрессии гена был сходен с нормой.

Таким образом, нами впервые были установлены достоверные отличия в уровне экспрессии *FCRL1* среди больных с рядом аутоиммунными и гематологическими заболеваниями по сравнению со здоровыми донорами. Что касается полученных нами корреляций между уровнем экспрессии *FCRL1* и определенным заболеванием, необходимы дальнейшие исследования функциональных свойств FCRL1 и его роли в этиологии этих заболеваний.

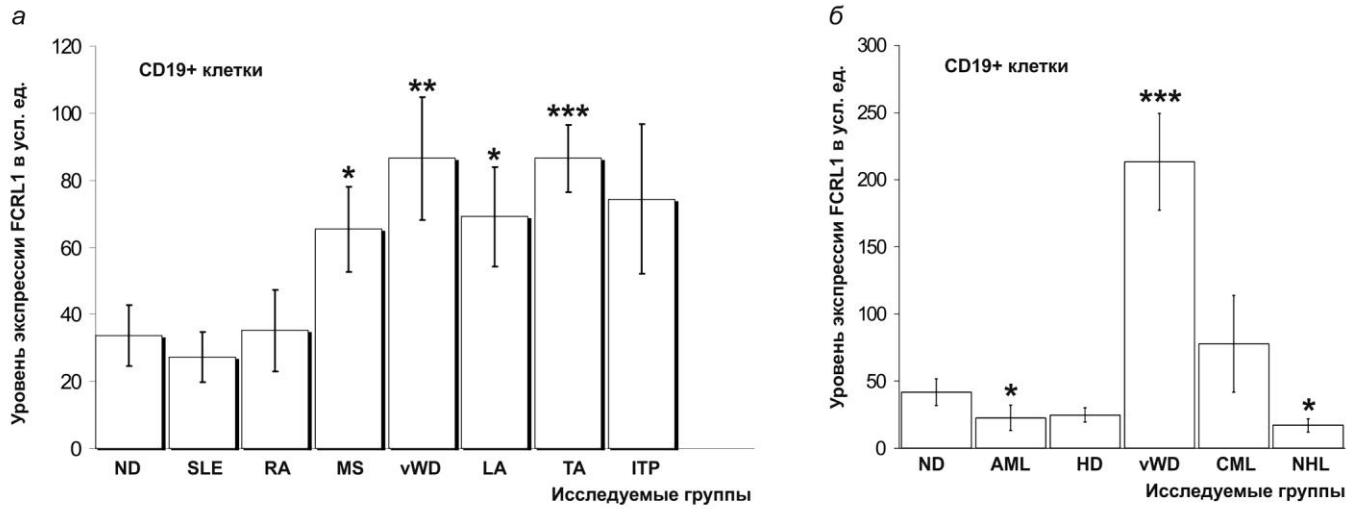

Рис. 1. Дот-гибридизация с нормированными образцами кДНК CD19+ клеток периферической крови при аутоиммунных заболеваниях (*а*) и гематологических заболеваниях (*б*). По оси абсцисс – исследуемые группы, по оси ординат – уровень экспрессии *FCRL1* в условных единицах. ND – норма, SLE – системная красна волчанка, RA - ревматоидный артрит, MS - рассеянный склероз, vWD - болезнь Виллебранда, LA - антифосфолипидный синдром, TA - артериите Такаясу, ITP – идиопатическая тромбоцитопения, AML - острая миелоидная лейкемия, HD - лимфома Ходжкина, CML - хроническая миелоидная лейкемия и NHL - неходжкинская лимфома.

При анализе *FCRL4* в периферической крови человека в норме, при аутоиммунных и гематологических заболеваниях ни один из образцов, нанесённых на мембраны, кроме образца с контрольной ДНК *FCRL4*, не дал положительного сигнала. Полученные нами результаты объясняются, очевидно, двумя причинами: отсутствием экспрессии гена *FCRL4* в клетках периферической крови, как в норме, так и при исследованных патологиях, и низким уровнем его экспрессии в клетке и/или ограниченностью популяции FCRL4+ клеток во вторичных лимфоидных органах. С этими объяснениями согласуются полученные нами ранее результаты ОТ-ПЦР на субпопуляциях лейкоцитов периферической крови здоровых доноров.

Получение поликлональных и моноклональных антител к FCRL1, FCRL4 и FCRL6

Основным инструментом для анализа экспрессии белка и его функции являются специфические антитела. С целью получения антител против FCRL1, FCRL4 и FCRL6 были созданы генетические конструкции для наработки внеклеточных областей этих белков. Использовали разные вектора и варианты химерных белков. Полученными конструкциями трансформировали *E. coli* и оценивали уровень экспрессии, растворимость химерных белков, а также возможности их эффективной очистки. Отобранные по совокупности качеств варианты использовали для препаративной наработки белка. Очищенными белками иммунизировали мышей и кроликов. В результате цикла из 4-х иммунизаций были получены 4 антисыворотки кролика против рекомбинантных белков FCRL1, и по две антисыворотки кролика против белков FCRL4 и FCRL6. Кроме того, нами были получены антипептидные антисыворотки к FCRL1.

Для получения гибридом, продуцирующих специфичные МКА против FCRL1, FCRL4, и FCRL6, использовали мышей с наивысшим титром специфичных антител в крови. В результате проведенного скрининга были получены три стабильных гибридных клона, продуцирующих антитела против FCRL1 (K11, K23 и K31), один клон против FCRL4 (R311) и три клона против FCRL6 (7B2, 7A11 и 5F8). Эти клоны размножали и прививали мышам линии BALB/c для получения асцитных жидкостей, из которых в последующем были выделены соответствующие МКА. Специфичность МКА контролировали по ходу получения с помощью иммуноферментного анализа. Дальнейшую проверку полученных МКА проводили на трансфицированных клетках с помощью методов иммуноцитохимического окрашивания, проточной

цитометрии и иммуноблоттинга. МКА K23 (FCRL1), R311 (FCRL4) и 7B2 (FCRL6) распознавали целевые белки в иммуноблоте, иммуноцито- и гистохимическом анализе, а также окрашивали 293T-трансфектанты в проточной цитометрии (рис. 2, на примере FCRL6-специфичного МКА 7B2). Таким образом, нами были получены антитела, позволяющие выявлять FCRL1, FCRL4, FCRL6 как в денатурированной, так и в нативной форме.

Анализ экспрессии FCRL1, FCRL4 и FCRL6 в клетках и тканях человека

Анализ экспрессии FCRL1 в мононуклеарных клетках периферической крови и клетках миндалины человека проводили с помощью иммунофлюоресцентного окрашивания клеток в суспензии и последующей проточной цитометрии. Мы обнаружили, что в миндалине человека FCRL1 экспрессируется на поверхности исключительно B-лимфоцитов: 95%-98% FCRL1+ клеток миндалины коэкспрессируют

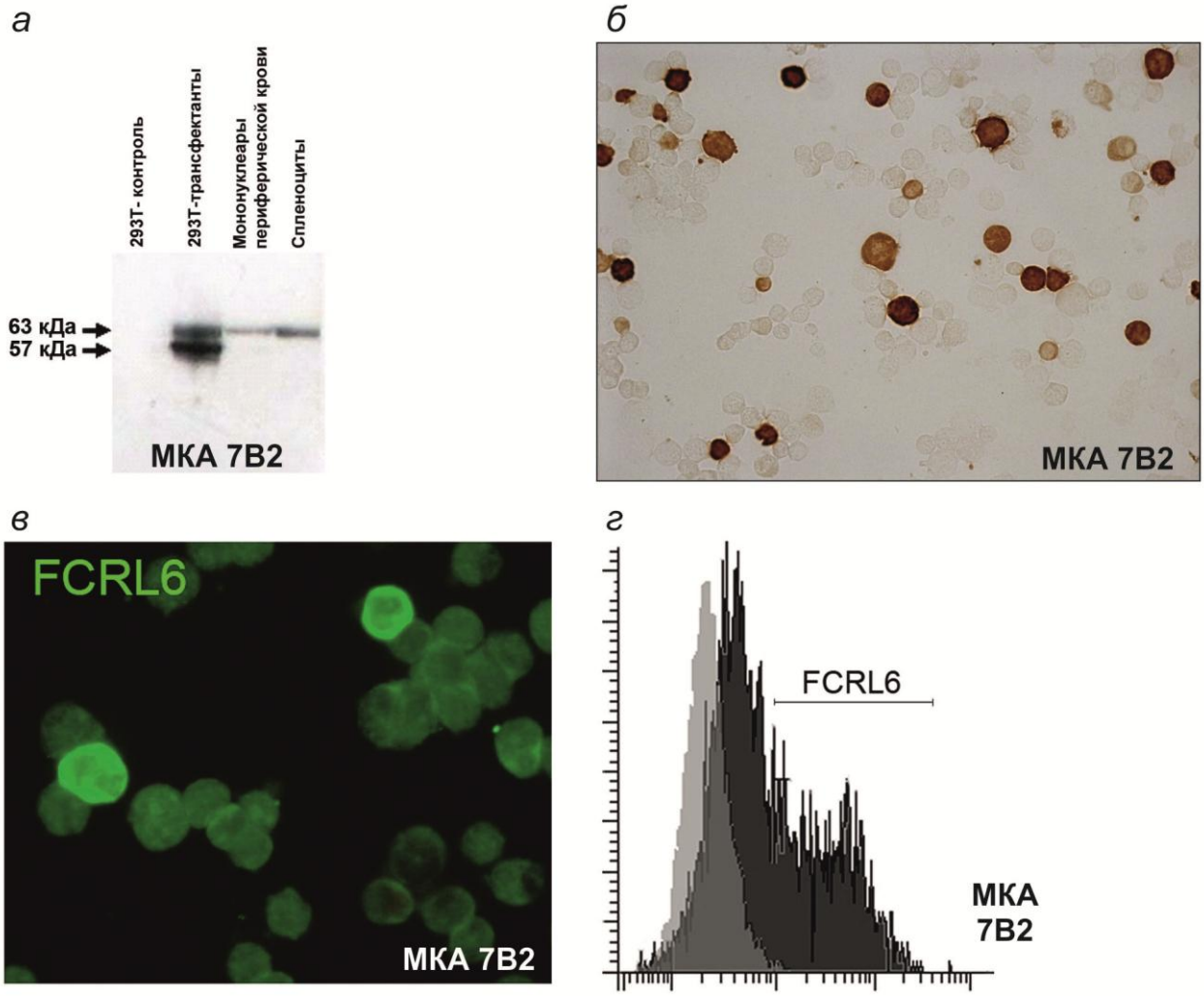

Рис. 2. Моноклональные антитела 7B2 специфично реагируют с FCRL6 в иммуноблоттинге трансфицированных 293T-клеток и спленоцитов человека (*а*); а также в иммуноцитохимическом окрашивании (*б*), иммунофлуоресцентном окрашивании (*в*) и цитометрическом анализе (*г*) FCRL6-трансфектантов.

маркер В-клеток CD19. В Т-лимфоцитах FCRL1 не обнаружен. FCRL1-позитивные клетки составляли ~10-15% от CD19+ В-лимфоцитов миндалины, что означает, что экспрессия FCRL1 не является конститутивной для В-клетки и связана, очевидно, с определенной стадией ее развития.

Иммунопероксидазное окрашивание криосрезов миндалины человека с использованием МКА K23 показало, что FCRL1+ клетки расположены в лимфоэпителии миндалины и в мантии вторичных лимфоидных фолликулов (рис. 3*а*). При окраске панели из криосрезов

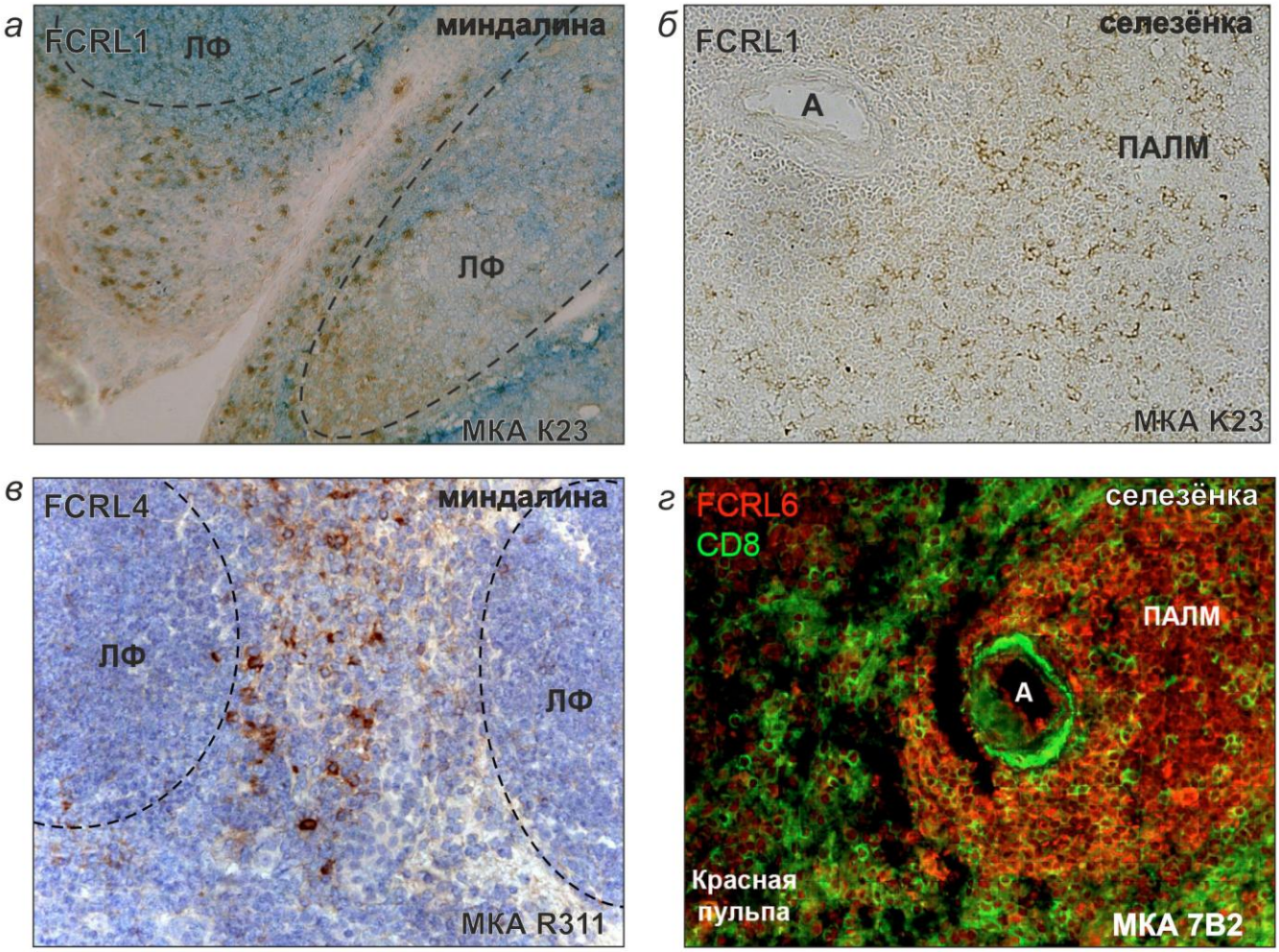

Рис. 3. Локализация FCRL1-, FCRL4- и FCRL6-экспрессирующих клеток в тканевых компартментах миндалины и селезёнки человека. (*а*) – FCRL1+ клетки располагаются в лимфоэпителии и в мантии вторичных лимфоидных фолликулов миндалины человека. (*б*) – FCRL1+ клетки локализуются в зоне В-клеточного фолликула периартериолярной лимфоидной муфты селезёнки человека. (*в*) – FCRL4+ клетки находятся в экстрафолликулярных областях и лимфоэпителии миндалины человека. (*г*) – FCRL6+ клетки сосредоточены в Т-клеточной зоне периартериолярной лимфоидной муфты.

различных тканей взрослого здорового человека (всего 19 тканей; Biochain, США) значительное количество FCRL1+ клеток было обнаружено в селезёнке (рис. 3*б*), где они располагались в зоне В-клеточного фолликула периартериолярной лимфоидной муфты. Таким образом, полученные данные показали, что FCRL1 экспрессируется субпопуляцией наивных В-лимфоцитов мантийной зоны вторичных лимфоидных фолликулов и отчасти зрелыми активированных В-лимфоцитами лимфоэпителия.

Изучение биохимических характеристик FCRL1 проводили на 293T-клетках, трансфицированных pCI-neo-FCRL1. Иммуноблоттинг трансфектантов клеток с использованием FCRL1-специфичных ПКА показал, что в этих клетках FCRL1 продуцируется в виде мономера с молекулярной массой 57 кДа, что превышало расчетную массу на 12 кДа. Использование дегликозилирующих ферментов для обработки лизатов клеток показало, что основной вклад в увеличение молекулярной массы FCRL1 вносит N-гликозилирование.

Проточная цитофлуорометрия FCRL4 в мононуклеарных клетках периферической крови и клетках миндалины человека показала, что в миндалине FCRL4 маркирует небольшую субпопуляцию В-клеток и характеризуется низким уровнем экспрессии: доля FCRL4+ клеток составляла от 0.9% до 2% от всех клеток или от 2 до 6% от CD19+ В-лимфоцитов миндалины. При окраске мононуклеаров, выделенных из 10 индивидуальных образцов периферической крови человека, количество FCRL4+ клеток варьировало от 0% до 0.05% от всех лейкоцитов, что свидетельствовало, скорее, об отсутствии экспрессии. Этот результат был ожидаемым. Отсутствие сигнала на FCRL4 в клетках периферической крови было нами ранее показано с помощью ОТ-ПЦР и дот-блот гибридизации.

Иммуногистохимическое исследование FCRL4 на замороженных срезах миндалины человека с помощью МКА R311, показало, что FCRL4+ клетки локализуются в экстрафолликулярных областях и лимфоэпителии (рис. 3*в*).

Анализ экспрессии FCRL6 в мононуклеарных клетках периферической крови и клетках селезёнки человека проводили с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания клеток в суспензии и последующей проточной цитометрии. Исследование образцов периферической крови здоровых доноров показало, что FCRL6 экспрессируется преимущественно на цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитах и CD56+ NK-клетках. Именно эти две субпопуляции лимфоцитов являются основными эффекторными компонентами

клеточного иммунного ответа, обеспечивающими защиту организма от вирус-инфицированных и злокачественно-трансформированных клеток. У отдельных индивидуумов была обнаружена очень низкая экспрессия FCRL6 на CD4+ Т-клетках. Вместе с этим экспрессия FCRL6 отсутствовала на CD19+ В-лимфоцитах. В селезёнке человека FCRL6 также экспрессировался преимущественно на CD8+ Т-клетках и CD56+ NK-клетках.

Полученные данные соответствуют нашим ОТ-ПЦР данным об экспрессии гена *FCRL6* (*IFGP6*) (Ershova et al., 2005) и демонстрирует уникальность этого рецептора в семействе FCRL, все остальные члены которого являются В-клеточными белками. Двойное иммуно-флуоресцентное окрашивание криосрезов селезёнки с помощью МКА 7В2 показало, что FCRL6+ клетки сосредоточены в основном в Т-клеточной зоне ПАЛМ, отдельные клетки встречаются в красной пульпе. У части FCRL6+ клеток наблюдали ко-экспрессию с CD8 (рис. 3*г*).

Иммуноблот-анализ трансфицированных 293Т-клеток показал наличие двух полос, соответствующих 57 и 63 кДа (Рис. 2а). Вместе с этим, на спленоцитах и мононуклеарах периферической крови наблюдали одну полосу, соответствующую 63 кДа. Наличие в трансфицированных клетках дополнительной полосы в 57 кДа можно объяснить неполным гликозилированием FCRL6 в этих клетках (расчётная молекулярная масса белка FCRL6 составляет 43,5 кДа).

Поиск лигандов FCRL1 и FCRL4

Для поиска белков, взаимодействующих с членами FCRL-семейства, в качестве основной стратегии нами был выбран метод экспрессионного клонирования (рис. 4). Эта работа включала в себя следующие этапы: 1) получение растворимых FCRL-зондов, обладающих ферментативной активностью, 2) использование зондов для идентификации клеток человека, экспрессирующих потенциальные лиганды 3) конструирование кДНК-библиотеки идентифицированных клеток в эукариотическом экспрессирующем векторе, 4) трансфекция 293Т-клеток кДНК-библиотекой и отбор трансфектантов, связывающих FCRL-зонды, 5) выделение плазмиды из отобранных трансфектантов и идентификация вставки.

В качестве зондов мы использовали химерные белки, состоящие из внеклеточных областей FCRL1 и FCRL4, слитых с плацентарной щелочной фосфатазой (АР). Отличительными особенностями плацентарной АР являются высокая ферментативная активность и термостабильность. Взаимодействие АР-содержащего белка с мишенью

Рис. 4. Схема поиска лигандов FCRL.

может быть выявлено с помощью хромогенных субстратов щелочной фосфатазы. При этом неспецифическая фосфатазная активность может быть удалена с помощью тепловой инактивации. При наработке химерного белка в культуре трансфицированных 293Т-клеток, как правило, не требуется его дополнительная очистка. Для скрининга используется кондиционированная трансфектантами среда. Необходимо отметить, что АР является димером и это свойство способствует увеличению авидности в случае, если лиганд имеет олигомерную структуру.

Для получения молекулярных зондов на основе плацентарной щелочной фосфатазы мы клонировали последовательности кДНК, соответствующие внеклеточным областям FCRL1 и FCRL4 в эукариотический экспрессирующий вектор pAPtag-5 в рамке с ДНК, кодирующей АР. Созданными генетическими конструкциями трансфицировали 293Т-клетки и оценивали уровень секреции химерных белков по активности АР. В качестве еще одного контроля были получены трансфектанты, продуцирующие только свободную АР. Анализ фосфатазной активности кондиционированной трансфектантами среды показал значительные различия между полученными белками, вместе с тем все полученные зонды оказались пригодными для использования в схеме экспрессионного клонирования.

Поскольку наибольший уровень экспрессии FCRL был обнаружен нами в миндалине и селезёнке, логично было предположить, что клетки этих органов могут экспрессировать макромолекулы, взаимодействующие с FCRL1 и FCRL4 и являющиеся функциональными лигандами этих рецепторов. Для проверки этого предположения мы инкубировали препараты криосрезов миндалины с кондиционированными средами, содержащими FCRL1-AP, FCRL4-AP и свободную АР. Связывание зондов определяли с помощью хромогенного субстрата АР. Окрашивание показало, что FCRL4-AP и FCRL1-AP взаимодействуют с клетками, имеющими разную локализацию. FCRL1-AP зонд связывался главным образом фолликулярными клетками, в то время как клетки, связывающие FCRL4-AP, располагались почти исключительно в лимфоэпителии селезенки. (рис. 5). Отсутствие окраски на контрольных препаратах, инкубированных со свободной АР, равно как и различный профиль связывания FCRL1-AP и FCRL4-AP, указывали на специфичность взаимодействия.

Для проведения процедуры экспрессионного клонирования потенциального лиганда FCRL4 была сконструирована кДНК-овая

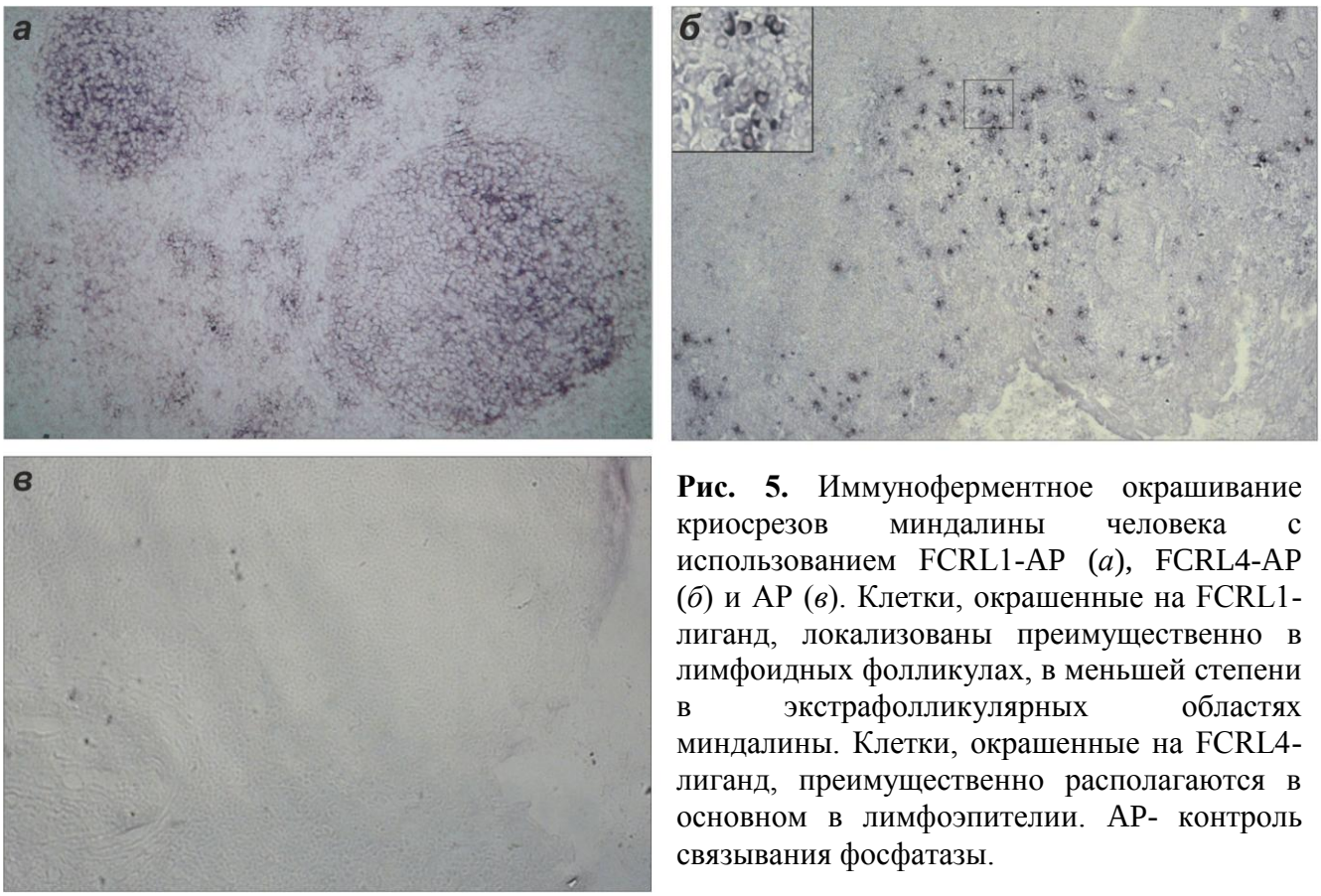

Рис. 5. Иммуноферментное окрашивание криосрезов миндалины человека с использованием FCRL1-AP (*а*), FCRL4-AP (*б*) и AP (*в*). Клетки, окрашенные на FCRL1-лиганд, локализованы преимущественно в лимфоидных фолликулах, в меньшей степени в экстрафолликулярных областях миндалины. Клетки, окрашенные на FCRL4-лиганд, преимущественно располагаются в основном в лимфоэпителии. AP- контроль связывания фосфатазы.

библиотека миндалины. Этой библиотекой трансфицировали 293T-клетки и окрашивали трансфектанты с помощью химерных белков FCRL4-AP. В качестве контроля использовали окраску свободной AP. Окрашенные клетки отбирали с помощью микроманипулятора, лизировали и выделяли плазмидную ДНК по стандартному протоколу с последующей трансформацией электрокомпетентных клеток. Выросшие на селективной среде колонии, анализировали с помощью ПЦР на наличие вставки. Из 15 полученных нами клонов, только три (№ 4, 5 и 9) содержали вставки и были отобраны для секвенирования. Секвенирование показало, что клоны №4 и №5 кодируют белки SMARCB1 и SART1. В силу своей внутриклеточной и внутриядерной локализации эти белки представляются менее вероятными кандидатами на роль лиганда для рецептора FCRL4. Клон №9 содержал последовательность, кодирующую галектин-9. Выделяют две формы галектина-9: внутриклеточную и мембранную. Мембранная форма галектина-9 потенциально могла бы связываться с рецептором FCRL4, обеспечивая рецептор-рецепторное взаимодействие В-лимфоцитов с другими типами клеток иммунной системы. И хотя нам пока не удалось напрямую продемонстрировать взаимодействие этих двух белков, галектин-9 остаётся вероятным кандидатом на роль лиганда FCRL4.

Мы также предположили, что лиганд FCRL4 может экспрессироваться на одной из лейкоцитарных клеточных линий. Мы протестировали одиннадцать клеточных линий человека, имеющих разное тканевое происхождение (K562 – эритроидная; MOLT4, Jurkat, MT4 – Т-лимфобластоидные; BJAB, Raji, BL2, Daudi, CBMI, IM9 – В-лимфобластоидные; HL60 – миелобластоидная; HeLa – эпителиальная) на способность связывать FCRL4-AP. Специфическое окрашивание было обнаружено только в случае В-клеточной лимфомы Raji. Эта линия будет использована для дальнейшего исследования лиганда(ов) FCRL4.

Разработка метода скрининга антител к эпитопам нативных белков

Одним из тестов на применимость зондов FCRL-AP для поиска лигандов была проверка их способности связываться с иммобилизованными антителами против FCRL, а также против расположенного на COOH-конце c-Myc эпитопа. Положительный результат этого теста позволил нам предположить, что AP-содержащие химерные белки, наработанные в эукариотических клетках (т.е. с правильным образованием дисульфидных связей и гликозилированием) могут быть использованы для разработки нового метода выявления антител против нативных эпитопов. Для того, чтобы подтвердить это предположение была проделана серия экспериментов. В качестве основы метода использовали схему прямого связывания антигена антителами, иммобилизованными на нитроцеллюлозной мембране (Рис. 6). На первом этапе в качестве универсального антитела использовали МКА против c-Myc эпитопа, входящего в состав трёх химерных FCRL-белков, FCRLA-AP, FCRL1-AP и FCRL4-AP. Свободный AP также содержит эпитоп c-Myc и, по сути, также является химерным. Отрицательным контролем были МКА против CD2 человека. По 1 мкл серийных разведений

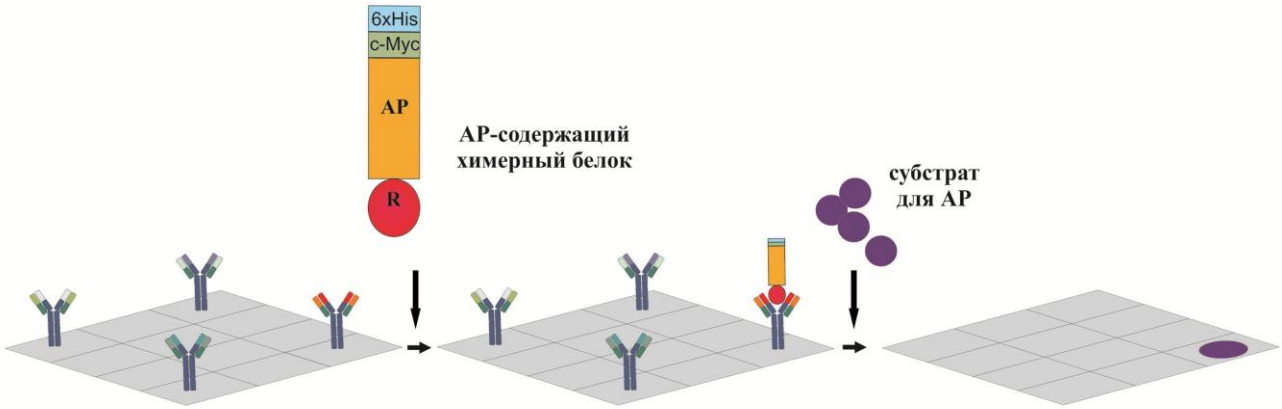

Рис. 6. Схема иммуноферментного анализа с использованием растворимого химерного белка, состоящего из антигенной части (R) и ферментативной метки - термостабильной щелочной фосфатазы (AP).

супернатантов, содержащих антитела перечисленных гибридом, наносили на нитроцеллюлозные мембраны. После блокировки мембраны инкубировали в кондиционированных трансфектантами средах, содержащих FCRLA-AP, FCRL1-AP, FCRL4-AP и AP-белки, затем отмывали и помещали в раствор, содержащий хромогенный субстрат для AP. Положительный сигнал проявлялся в виде пятен различной интенсивности. Результаты показали, что прямой антиген-связывающий анализ с использованием AP-химерных белков позволяет выявлять иммобилизованные на нитроцеллюлозе антитела с высокой чувствительностью, достаточной для скрининга гибридом.

Возможность использования данного метода для выявления антител против нативных эпитопов проверяли, анализируя образцы супернатантов гибридом, продуцирующих МКА против FCRLA (клоны M101, M203, M204, M616), FCRL1 и FCRL4. Эти гибридомы были отобраны на основе результатов ИФА с использованием антигенов, наработанных в бактериальной экспрессирующей системе. Далее мы проверяли способность трёх клонов МКА против FCRL1 (клоны K11, K23, K32) и один против FCRL4 (R311) связывать соответствующие им молекулярные зонды. Три клона МКА, распознающих рекомбинантный FCRL1, реагировали с белком FCRL1-AP по-разному. Только один из них, K23, давал положительную специфическую реакцию при инкубации с FCRL1-AP (рис. 7). Наиболее вероятное объяснение последнего факта заключается в том, что FCRL1 и FCRL4 принадлежат к одному семейству

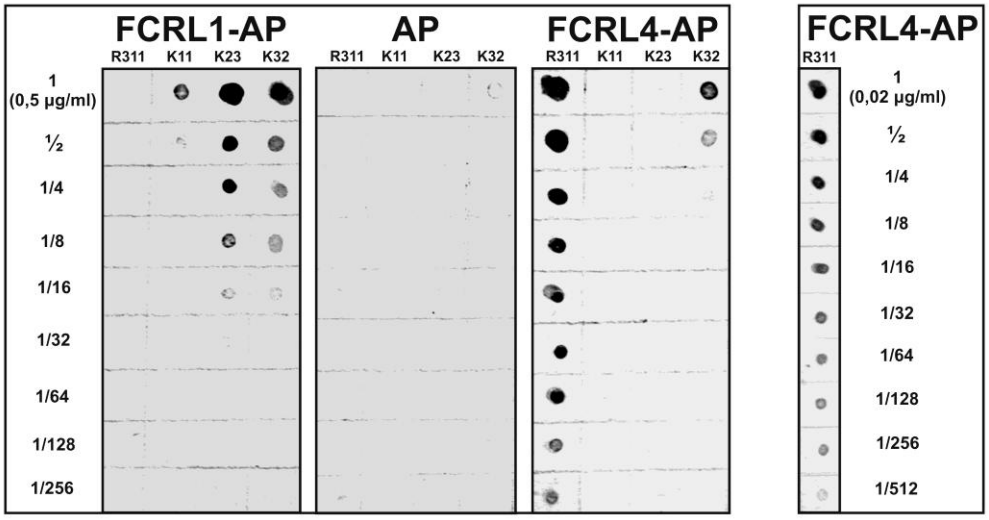

Рис. 7. Прямой антиген-связывающий анализ FCRL1-(K11, K23 и K32) и FCRL4-(R311) специфичных МКА. Афинно очищенные МКА R311, K11, K23 и K32 титровали двукратными разведениями в PBS и наносили на нитроцеллюлозную мембрану. Мембраны инкубировали с FCRL1-AP, AP и FCRL4-AP.

и обладают значительным сходством (~70% идентичных остатков) в D3- и D4- доменах. Способность клона K23 связывать нативный эпитоп подтверждается его способностью окрашивать FCRL1 на поверхности FCRL1-293T-трансфектантов и на поверхности B-лимфоцитов. МКА K11 показали отсутствие реакции с FCRL1-AP, что согласуется с их неспособностью реагировать с FCRL1 на поверхности клеток. Реакция МКА K32 с FCRL1 не может считаться специфической – они, хотя и реагировали с FCRL1-AP в разведениях до 1:16, давали перекрестную реакцию с FCRL4-AP.

Важнейшей характеристикой любого иммунохимического метода является его чувствительность, т.е. нижний предел концентрации выявляемого реагента. Минимальная концентрация IgG, давшая положительную реакцию в случае очищенных МКА311, составила 40 нг/мл, что соответствует 40 пг в точке нанесения (рис. 7).

Эти результаты, а также полученные нами данные по анализу FCRLA-специфичных МКА и различных серий ПКА против белков FCRL-семейства (в том числе противопептидных) показали, что AP-содержащие белки являются эффективными реагентами для выявления специфических антител против нативных эпитопов. Такие белки могут быть наработаны с помощью простой временной трансфекции 293T-клеток. Поскольку метка является частью секретируемой молекулы, отпадает необходимость проводить очистку такого белка. 2 мл кондиционированной трансфектантами среды достаточно для одновременной обработки 4 мембран размером 50x30мм, содержащей 240 нанесенных образцов. Поскольку для анализа достаточно 1 мкл исследуемого образца, при иммуноскрининге гибридом прямой антиген-связывающий метод может быть использован параллельно со стандартным ИФА. Важно отметить, что предлагаемый метод можно использовать для оценки наличия антител против нативных эпитопов до стадии получения гибридом. При иммунизации панелью пептидных конъюгатов, легко будет выбрать тот пептид, который соответствует нативному эпитопу. Еще два достоинства данной схемы могут быть использованы независимо от того, какие антигены использовались для иммунизации. При направленном получении антител, распознающих различные функциональные домены белков, достаточно создать серию конструкций, обеспечивающих экспрессию химер, отличающихся доменным составом антигенной части. Если белок–мишень является членом семейства родственных белков, очень велика вероятность того, что полученные МКА будут реагировать с другими членами семейства, как это видно на примере МКА K32. Использование AP-содержащих

белков может существенно упростить процедуру выбора МКА, специфично распознающих отдельные члены семейства.

ВЫВОДЫ

1. Определён профиль экспрессии гена *FCRL1* человека в норме и при патологиях. Обнаружены достоверные изменения по сравнению с нормой уровня экспрессии гена *FCRL1* в клетках периферической крови человека при ряде аутоиммунных и гематологических заболеваний: рассеянном склерозе, антифосфолипидном синдроме, артериите Такаясу, болезни Виллебранда, острой миелоидной лейкемии и неходжкинской лимфоме. Установлено, что ген *FCRL4* человека не экспрессируется клетками периферической крови в норме и при исследованных патологиях.

2. Получены и охарактеризованы поликлональные и моноклональные антитела, специфично выявляющие новые иммунорегуляторные рецепторы человека FCRL1, FCRL4 и FCRL6. Полученные антитела применимы в широком спектре иммунохимических методов и являются эффективным инструментом исследования этих белков.

3. С помощью полученных антител установлены фенотипы и тканевая локализация экспрессирующих FCRL1, FCRL4 и FCRL6 клеток, а также определены биохимические характеристики этих белков. Установлено, что рецептор FCRL1 представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 57 кДа и является маркером субпопуляции зрелых В-лимфоцитов селезёнки, миндалины и периферической крови человека. Обнаружено, что белок FCRL4 экспрессируется на поверхности зрелых В-лимфоцитов, образующих малочисленную субпопуляцию нециркулирующих, оседлых лимфоцитов, локализующихся в экстрафолликулярных областях вторичных лимфоидных органов. Установлено, что белок FCRL6 имеет молекулярную массу 63 кДа и экспрессируется на поверхности цитотоксических лимфоцитов в периферической крови и вторичных лимфоидных органах человека.

4. Установлено, что белок, взаимодействующий с FCRL1, локализован в клетках лимфоидных фолликулов и экстрафолликулярных областей, а с FCRL4 – в клетках лимфоэпителия миндалины и В-клеточной линии Raji. Потенциальным кандидатом на роль лиганда FCRL4 является галектин-9.

5. Разработан эффективный метод выявления антител против нативных эпитопов в антисыворотках, полученных при иммунизации пептидами

и рекомбинантными антигенами. Метод может быть использован для массового скрининга гибридом при производстве моноклональных антител.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Baranov K.**, Volkova O., Chikaev N., Mechetina L., Laktionov P., Najakshin A., Taranin A. A direct antigen-binding assay for detection of antibodies against native epitopes using alkaline phosphatase-tagged proteins // J Immunol Methods. 2008. V. 332. P. 73-81.
2. Kulemzin S.V., Zamoshnikova A.Y., Yurchenko M.Y., Vitak N.Y., Najakshin A.M., Fayngerts S.A., Chikaev N.A., Reshetnikova E.S., Kashirina N.M., Peclo M.M., Rutkevich P.N., Shevelev A.Y., Yanushevskaya E.V., **Baranov K.O.**, Mamonkin M., Vlasik T.N., Sidorenko S.P., Taranin A.V., Mechetina L.V. FCRL6 receptor: expression and associated proteins // Immunol Lett. 2011. V. 134 P. 174-182.
3. **Баранов К.О.**, Волкова О.Ю., Мечетина Л.В., Чикаев Н.А., Решетникова Е.С., Никулина Г.М., Таранин А.В., Наякшин А.М. Экспрессия гена FCRL1 человека в норме и при аутоиммунных заболеваниях // Молекулярная биология. 2012. V. 46 №2 С. 1-8.
4. **Баранов К.О.**, Мечетина Л.В., Чикаев Н.А., Волкова О.Ю., Таранин А.В., Наякшин А.М. Поиск лигандов рецепторов FCRL-семейства // Фундаментальные науки – медицине. Новосибирск, Россия. 2-5 сентября 2008 г. С. 99-101.
5. Алябьев Б.Ю., Гусельников С.В., Ершова С.А., **Баранов К.О.**, Горчаков Р.В. Структурно-функциональный анализ FcR-подобных GBS/IFGP рецепторов человека и мыши // Материалы отчетной конференции молодых ученых-грантодержателей биологических институтов СО РАН посвященной М. А. Лаврентьеву. Новосибирск, Россия, 4-7 декабря, 2001, часть II, С. 9-11.
6. Taranin A.V., Volkova O.Y., Mechetina L.V., Najakshin A.V., Faizulin R.Z., **Baranov K.O.**, Gorchakov R.V., Chikaev N.A., Guselnikov S.V., Ershova S.A. Generation and characterization of monoclonal and polyclonal antibodies against novel human B-cell antigens // Proceedings of the 14th International Conference on Lymphatic Tissues and Germinal Centers in Immune Reactions. Groningen, Netherlands. 23-27 June, 2002. P. 42.
7. Taranin A.V., Najakshin A.M., Mechetina L.V., Ershova S.A., Volkova O.Y., Chikaev N.A., **Baranov K.O.**, Guselnikov S.V., Bykova E.A. The human and mouse FcR-like molecules: species-specific architecture and

cell distribution // Proceedings of the EURESCO conference "B cells in health and disease". Maratea, Italy. 10-15 May 2003.

8. Taranin A.V., Najakshin A.M., Mechetina L.V., Volkova O.Yu., Chikaev N.A., Ershova S.A., Guselnikov S.V., **Baranov K.O.** The newly defined human and mouse FcR-like proteins: diverse architecture and species-specificity of expresion patterns // Proceedings of the 12th Symposium on signals and signal processing in the immune system. Sopron, Hungary. 3-7 September, 2003, P. 37-38.
9. Ершова С.А., **Баранов К.О.**, Гусельников С.В. Функциональный анализ рецепторов IFGP семейства // Материалы отчетной конференции молодых ученых-грантодержателей биологических институтов СО РАН посвященной М. А. Лаврентьеву. Новосибирск, Россия, 1-3 декабря, 2003, часть II, С. 155.
10. Таранин А.В., Наякшин А.М., Мечетина Л.В., Волкова О. Ю., Чикаев Н.А., Ершова С.А., Гусельников С.В., **Баранов К.О.** FcR-подобные белки: новое семейство маркеров В-лимфоцитов человека // Материалы Объединенного иммунологического форума. Екатеринбург, Россия. 31 мая – 4 июня 2004. Российский иммунологический журнал. Т. 9. С. 81.
11. Гусельников С.В., Ершова С.А., **Баранов К.О.** Функциональный анализ рецепторов IFGP семейства, экспрессирующихся в В-клетках // Материалы отчетной конференции молодых ученых-грантодержателей биологических институтов СО РАН посвященной М. А. Лаврентьеву. Новосибирск, Россия, 17-19 ноября, 2004. часть II, С. 142.
12. Taranin A.V., Najakshin A.M., Mechetina L.V., Volkova O.Y., Chikaev N.A., Ershova S.A. **Baranov K.O.**, Guselnikov S.V. FcR-like proteins: a newly defined group of remarkably diverse molecules differentially expressed in lymphocytes // Proceeding of 7th John Humphrey Advanced Summer Programme in Immunology. Moscow, Russia. 5-9 September 2005. P. 7.
13. **Baranov K.O.**, Mechetina L.V., Volkova O.Y., Chikaev N.A., Taranin A.V., Najakshin A.M. Searching for ligands of the FcR-like B cell-specific receptors // Proceedings of the 13th International Congress of Immunology. Rio de Janeiro, Brazil, 21-25 August 2007. P. 54.
14. **Baranov K.O.**, Mechetina L.V., Volkova O.Y., Chikaev N.A., Taranin A.V., Najakshin A.M. Human B cell-specific receptors FCRL1 and FCRL4: ligand identification //Proceeding of 8th John Humphrey Advanced Summer Programme in Immunology. Moscow, Russia. 10-14 September 2007. P. 7.

15. **Baranov K.**, Mechetina L., Volkova O., Chikaev N., Taranin A., Najakshin A. Human FcR-like B cell specific receptors: ligand searching // Proceedings of the 21st International Mammalian Genome Conference. Kyoto, Japan. 28 October – 1 November 2007. P. 178.
16. **Баранов К.О.**, Волкова О.Ю., Наякшин А.М., Мечетина Л.В. Новый метод скрининга антител против нативных эпитопов редких антигенов // Материалы Объединенного иммунологического форума. Санкт-Петербург, Россия. 30 июня – 5 июля 2008. Российский иммунологический журнал. Т. 2 № 2-3 С. 14.
17. **Konstantin O. Baranov**, Ludmila V. Mechetina, Olga Y. Volkova, Nikolai A. Chikaev, Alexander V. Taranin, Alexander M. Najakshin. Searching for ligands of the FcR-like B cell-specific receptors // Proceedings of the 9th International Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. Barcelona, Spain. 11-13 March 2010.