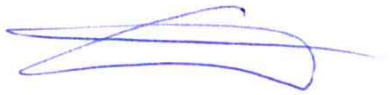
На правах рукописи



Кулемзин Сергей Викторович

«Функциональный анализ лимфоцитарных белков человека FCRLA 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 Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Таранин Александр Владимирович** доктор биологических наук, заведующий лабораторией иммуногенетики Федерального государственного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Официальные оппоненты: **Закиян Сурен Минасович** доктор биологических наук, заведующий лабораторией эпигенетики развития Федерального государственного учреждения науки Институт Цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск.

Лактионов Павел Петрович кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной медицины Федерального государственного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение “ГНЦ Институт иммунологии” Федерального Медико-Биологического Агенства, г. Москва

Защита состоится: 18 июня 2014 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (630090, Новосибирск, пр. 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

Актуальность исследования

В геноме человека имеются сотни генов, экспрессия которых ограничена клетками иммунной системы. Большая часть этих генов кодирует поверхностные рецепторы. Некоторые из них непосредственно вовлечены в распознавание чужеродных патогенов, другие участвуют в межклеточных взаимодействиях при развитии иммунного ответа и в транспорте клеток. Часть специфичных для иммунной системы генов кодирует внутриклеточные белки, ответственные за трансдукцию сигналов от поверхностных рецепторов и утилизацию антигена. Несмотря на впечатляющий прогресс иммунологии и иммуногенетики в течение последних пятидесяти лет, функция многих генов, специфично экспрессирующихся в клетках иммунной системы, остается неизвестной. В практическом плане, имеющиеся пробелы в знаниях ограничивают возможности эффективно управлять иммунным ответом и лечить многие социально значимые заболевания.

Относительно недавно несколькими группами исследователей и, в том числе, лабораторией иммуногенетики, было описано семейство генов, кодирующих FcR-подобные белки лимфоцитов человека – FCRL (Fc Receptor-Like). Шесть членов этого семейства (FCRL1-FCRL6) являются трансмембранными рецепторами и экспрессируются на поверхности лимфоцитов. Еще два, FCRLA и FCRLB, являются внутриклеточными белками (Guselnikov, 2002; Mechetina, 2002; Ershova, 2005; Davis, 2007).

FCRLA на высоком уровне экспрессируется в В-клетках зародышевых центров вторичных лимфоидных органов, где, как известно, происходит активация и дифференцировка В-лимфоцитов в плазматические клетки и В-клетки памяти. Сведения о функции FCRLA отсутствуют, однако профиль экспрессии, внутриклеточная локализация и гомология с Fc-рецепторами, позволяют предположить, что FCRLA участвует в процессах регуляции синтеза и созревания иммуноглобулинов.

Уникальной в рамках FCRL-семейства особенностью FCRL6 является экспрессия на цитотоксических Т- и NK-лимфоцитов человека. Цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) являются основными эффекторами клеточного иммунного ответа, направленного на элиминацию вирус-инфицированных или злокачественно-трансформированных клеток. Для успешного функционирования клеточного звена иммунного ответа необходима точная регуляция степени активации ЦТЛ, так как избыточная или недостаточная активность этих клеток в скором времени приводит к развитию иммунопатологий. Прецизионная регуляция активности ЦТЛ осуществляется множеством активирующих и ингибирующих рецепторов, приобретенных иммуной системой в процессе эволюции.

FCRL6 является наименее изученным трансмембранным рецептором семейства FCRL, однако структура его цитоплазматической части и предварительные данные о характере его экспрессии, указывают на то что FCRL6 является ингибирующим рецептором.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы является изучение функций FCRLA в В-лимфоцитах, а также исследование функциональной активности рецептора лимфоцитов человека FCRL6 в норме и при патологии.
Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить клеточные компартменты, в которых локализованы наиболее распространенные изоформы FCRLA, модификацию, локализацию и характер его мембранной ассоциации.
2. Установить участки FCRLA, влияющие на его локализацию и ответственные за взаимодействие с лигандами.
3. Идентифицировать белки, с которыми FCRLA взаимодействует внутри клетки.
4. Изучить фосфорилирование FCRL6 и особенности связывания этого белка с сигнальными молекулами.
5. Проанализировать изменения экспрессии FCRL6 при хронических вирусных инфекциях (на примере ВИЧ-инфекции).

Научная новизна
Обнаружено, что FCRLA экспрессируется в виде нескольких изоформ, отличающихся последовательностью сигнального пептида и количеством доменов. Установлено, что четырехдоменные изоформы FCRLA с коротким и длинным сигнальным пептидом, а также двухдоменная изоформа с коротким сигнальным пептидом локализованы исключительно в эндоплазматическом ретикулуме. Четырехдоменная изоформа FCRLA ориентирована внутрилюменально и является мембранно-ассоциированным белком. Идентифицирован домен FCRLA, определяющий его локализацию в ЭР и показано, что свободный цистеин FCRLA не участвует в локализации FCRLA в ЭР. Выяснен механизм, который определяет локализацию двухдоменной изоформы FCRLA с коротким сигнальным пептидом в ЭР. Показано, что в клеточной линии BJAB, являющейся моделью активированных В-лимфоцитов, FCRLA взаимодействует с μ-цепью IgM, BiP и MHC II. На основании полученных нами данных, можно предположить, что FCRLA проявляет себя как специфический В-лимфоцитарный шаперон/транспортер. Обнаружено взаимодействие сигнальных белков SHP-1, SHP-2, SHIP-1, SHIP-2, Grb2 с ITIM мотивами в цитоплазматической области FCRL6 на модели in vitro. Показана роль отдельных аминокислотных остатков тирозина в этом взаимодействии. Выявлена отрицательная корреляция между уровнем экспрессии рецептора лимфоцитов человека FCRL6 и количеством CD4+ клеток у ВИЧ-инфицированных больных.

Научно-практическая ценность
Полученные в настоящей работе данные дополняют современные представления о рецепторах В- и Т-лимфоцитов. Впервые получены сведения о внутриклеточной локализации FCRLA, взаимодействующих с ним белках и влиянии сигнального пептида FCRLA на транспорт изоформ. Обнаруженная нами положительная корреляция между уровнем экспрессии FCRL6 и степенью прогрессии СПИДа, позволяет

рассматривать FCRL6 в качестве потенциального прогностического маркера тяжести ВИЧ-инфекции.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

Основная изоформа белка В-лимфоцитов человека FCRLA является резидентным фактором эндоплазматического ретикулума. FCRLA вместе с BiP и β-цепью HLA-DR входит в состав высокомолекулярного комплекса. FCRLA взаимодествует с μ-цепью IgM.

Белок Т-лимфоцитов человека FCRL6 взаимодействует с сигнальными белками SHP-1, SHP-2, SHIP-1 и SHIP-2. Экспрессия FCRL6 коррелирует со степенью прогрессии СПИДа у больных ВИЧ-инфекцией.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на:
13-м Международном иммунологическом конгрессе, Монреаль, Канада, 2006;
2-м Европейском конгрессе иммунологов, Берлин, Германия, 2009;
Отчетных сессиях аспирантов Института цитологии и генетики СО РАН в 2008 и 2009 годах.
Конференции «Фундаментальные науки — медицине», Новосибирск, 2011.

Вклад автора

Автором выполнена практически вся экспериментальная работа, описанная в диссертации, за исключением отдельных случаев создания реагентов или проведения анализов, что отражено в тексте работы. Подготовка публикаций проводилась автором совместно с А.В. Тараниным, Л. В. Мечетиной и А. М. Наякшиным.

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы, содержащего 169 ссылок, и приложения. Диссертация изложена на 94 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы и 28 рисунков.

Материалы и методы

Для выполнения представленной работы был применен широкий спектр методов работы с нуклеиновыми кислотами, белками и эукариотическими клетками: Клонирование ДНК; анализ экспрессии транскриптов методом ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени; наработка и очистка рекомбинантных белков в системе E. coli; нативный синий электрофорез белковых комплексов; масс-спектрометрический анализ белков; иммунопреципитация и иммуноблот; аффинная хроматография; трансфекция и трансдукция эукариотических клеток; иммунофлюоресцентное окрашивание клеток; проточная цитометрия.

Результаты и обсуждение

Изучение функциональной активности изоформ FCRLA

Анализ экспрессии изоформ FCRLA

Ранее было обнаружено, что FCRLA имеет несколько изоформ, отличающихся доменным составом. Поскольку, экспрессия изоформ FCRLA в различных клетках не была исследована, необходимо было выяснить, какие изоформы FCRLA являются доминирующими, а также провести поиск новых изоформ. Для решения этой задачи мы провели серию ОТ-ПЦР с различными, FCRLA-специфическими, праймерами, использовав как матрицу мРНК из миндалины и селезенки человека. Продукты ОТ-ПЦР были клонированы и секвенированы.

Нами были обнаружены два фактора, обеспечивающие многообразие изоформ FCRLA: вариации доменного состава и два различных сигнальных пептида. Изоформы FCRLA образованы пятью комбинациями доменов. Кроме того, в различных изоформах FCRLA было идентифицировано два разных сигнальных пептида: длинный сигнальный пептид (далее LSP), кодированный двумя первыми экзонами FCRLA, и короткий сигнальный пептид (далее SSP), кодированный только первым экзоном. Таким образом, генерируется семь изоформ, из которых только четырехдоменная и двухдоменная содержат оба типа сигнальных пептидов, как LSP так и SSP. Остальные найденные нами варианты изоформ FCRLA содержат только короткий сигнальный пептид SSP (Рис. 1А). ОТ-ПЦР с праймерами-дискриминаторами на различные экзоны FCRLA позволил определить, что в миндалине и селезенке человека

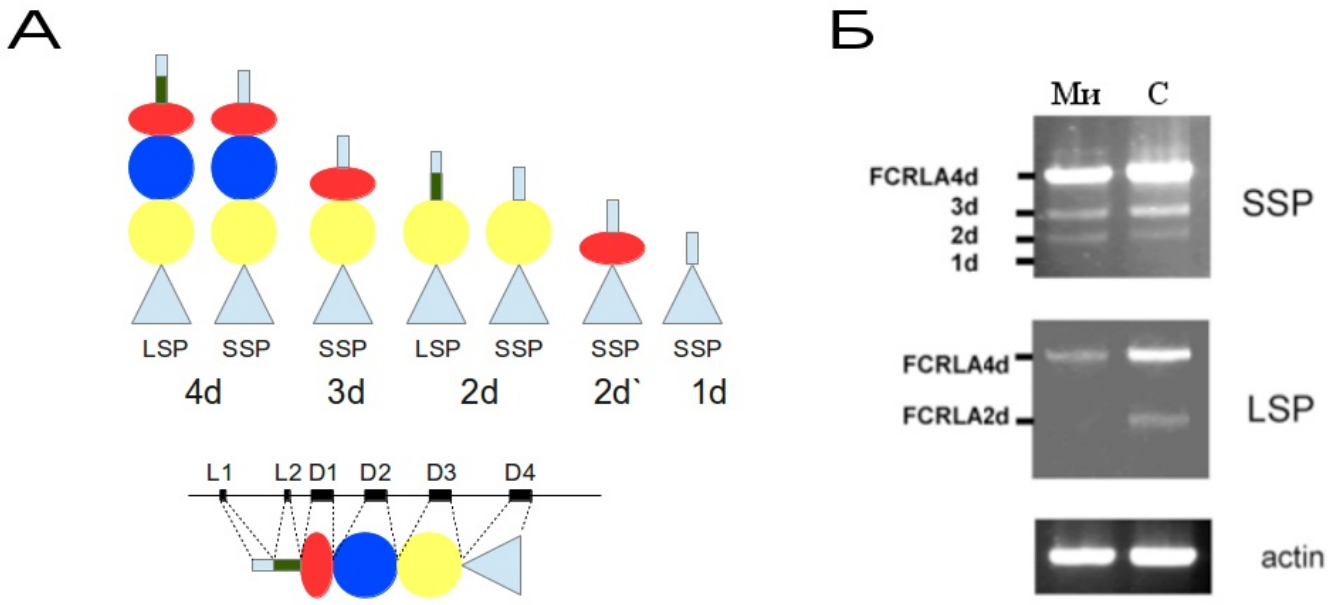


Рис. 1. Многообразие изоформ FCRLA, исследованное в настоящей работе.

(А) Схематически изображены обнаруженные изоформы и их соответствие экзон-интронной структуре FCRLA. (Б) Экспрессия изоформ FCRLA в органах человека. Электрофорез продуктов ОТ-ПЦР в 1% агарозном геле. Ми – миндалина, С – селезенка.

доминирует четырехдоменная изоформа с коротким сигнальным пептидом (Рис. 1Б). Возможно, профиль экспрессии изоформ FCRLA меняется в зависимости от стадии В-клеточной активации/дифференцировки, поэтому целесообразным является изучение функций не только доминирующей, но и менее представленных изоформ FCRLA.

Исследование внутриклеточной локализации изоформ FCRLA.
Чтобы проверить, все ли изоформы FCRLA имеют внутриклеточную локализацию, мы провели трансфекцию кДНК двухдоменных изоформ с коротким и длинным сигнальным пептидом в 293 Т клетки. Супернатанты кондиционированных сред трансфицированных клеток и их лизаты были проанализированы при помощи Вестерн-блота и ELISA. Полученные результаты показали эффективную секрецию двухдоменной изоформы с длинным сигнальным пептидом (LSP-FCRLA2d), и полное отсутствие секреции в случае других изоформ. Примечательно, что двухдоменная изоформа с коротким сигнальным пептидом не секретировалась. При помощи иммунофлуоресцентного окрашивания и конфокальной микроскопии был проведен анализ внутриклеточной локализации двух- и четырехдоменных изоформ FCRLA с коротким и длинным сигнальными пептидами. В качестве маркеров клеточных компартментов использовались белки кальнексин (маркирует ЭР) и p58K (маркер аппарата Гольджи). Все проанализированные изоформы колокализуются с кальнексином, следовательно присутствуют в ЭР, и только одна изоформа LSP-FCRLA2d колокализуется также с p58K, что свидетельствует об её экспорте из ЭР в Гольджи (Рис. 2). Этот результат согласуется с данными по секреции, так как секретируемые белки в ходе своего транспорта из клетки должны миновать аппарат Гольджи. Таким образом, основная — четырехдоменная изоформа FCRLA является резидентным белком ЭР, и не транспортируется в аппарат Гольджи. Двухдоменные изоформы отличаются по локализации в зависимости от длины их сигнального пептида: изоформа с коротким сигнальным пептидом задерживается в ЭР, а изоформа с длинным сигнальным пептидом транспортируется дальше в аппарат Гольджи, после чего секретируется из клетки.

Исследование статуса гликозилирования различных изоформ FCRLA.
Анализ первичной структуры FCRLA показал отсутствие сайтов N-гликозилирования и наличие потенциальных сайтов O-гликозилирования, особенно богат которыми оказался С-концевой муцин-подобный домен. Так как O-гликозилирование происходит в аппарате Гольджи, но не в ЭР, изоформы FCRLA, не транспортируемые за пределы ЭР, должны быть негликозилированными белками. Анализ профиля гликозилирования LSP-FCRLA2d и FCRLA4d при помощи дегликозилаз (N- и O- гликаназы, сиалидаза А) показал отсутствие присоединенных к FCRLA4d остатков сахаров и наличие O-гликозилирования у секретируемой LSP-FCRLA2d изоформы.

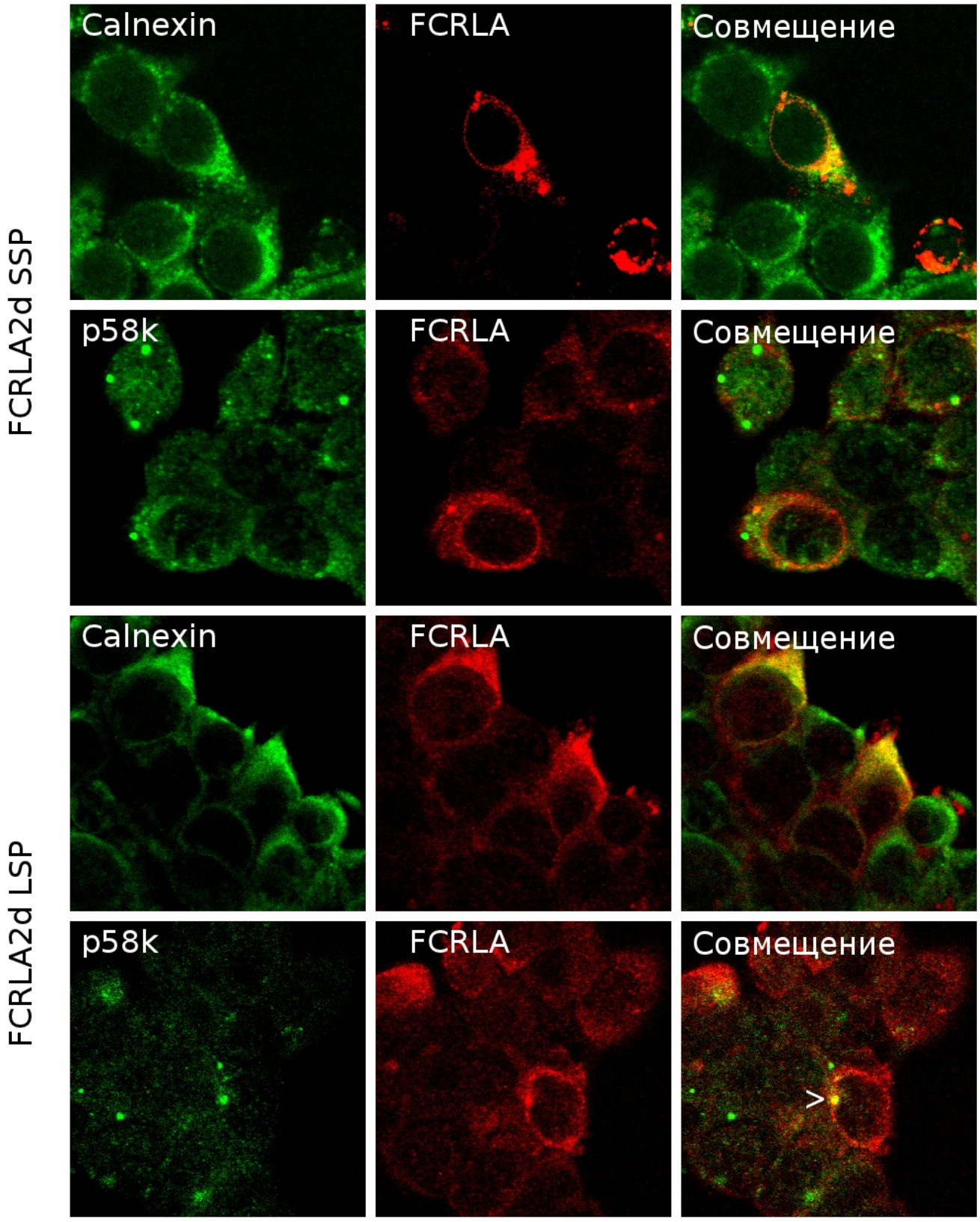


Рис. 2. Внутриклеточная локализация двухдоменных изоформ FCRLA человека с различными сигнальными пептидами. Конфокальная микроскопия 293 Т клеток, трансфицированных кДНК FCRLA2d LSP и SSP (указано слева) иммунофлуоресцентно окрашенных на FCRLA и маркеры ЭПР (Calnexin) и Гольджи (p57k). FCRLA2d SSP изоформа локализована в ЭПР и отсутствует в аппарате Гольджи, изоформа с длинным сигнальным пептидом успешно транспортируется в аппарат Гольджи. Белым указателем отмечена колоколизация FCRLA2d LSP и p57k.

Сигнальный пептид отщепляется в процессе созревания большинства изоформ FCRLA.

Так как ранее мы показали, что изоформы FCRLA, задерживающиеся в ЭР, не гликозилированы in vivo, мы смогли использовать синтезированный в E. coli рекомбинантный FCRLA4d с коротким сигнальным пептидом, как контроль молекулярной массы. Плазмиды, кодирующие FCRLA4d с коротким, либо с длинным сигнальным пептидом, трансфицировались в 293 T клетки. Лизаты трансфицированных клеток вместе с рекомбинантным SSP-FCRLA4d анализировали вестерн-блот анализом в градиентных гелях (Рис. 3А). Оказалось, что масса FCRLA4d из трансфицированных эукариотических клеток меньше массы рекомбинантного контроля на 2 кДа, что соответствует расчётной массе отщепляемого сигнального пептида.

На рисунке 3Б можно видеть различную подвижность LSP и SSP изоформ FCRLA2d. Разница составляет около 2 кДа, что, как указанно выше, соответствует массе сигнального пептида. Таким образом, длинный сигнальный пептид отщепляется от двухдоменной изоформы FCRLA, тогда как короткий не отщепляется.

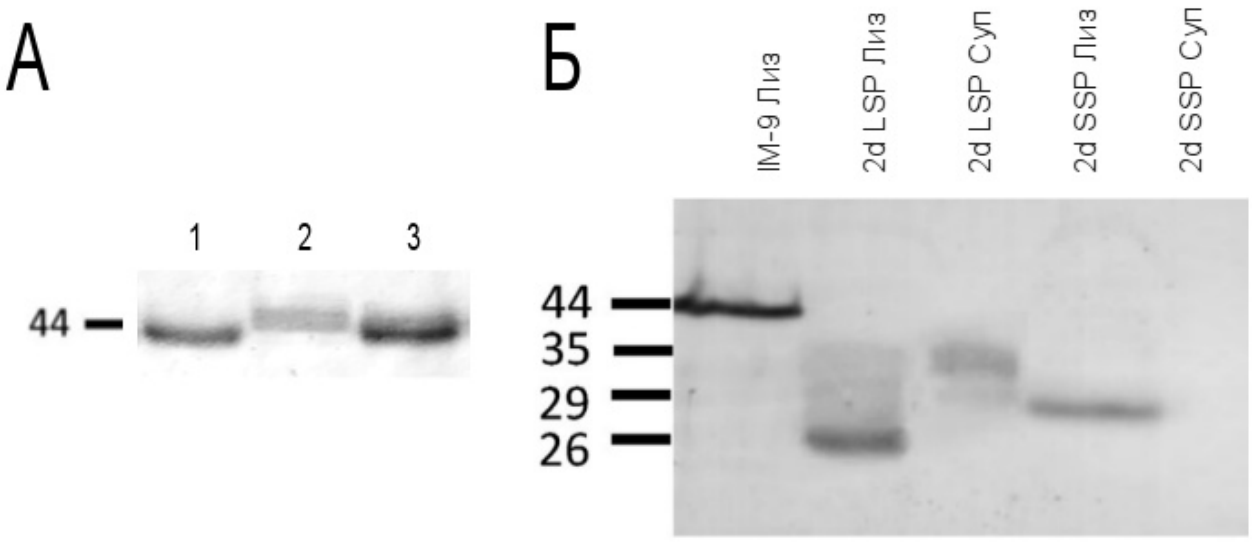


Рис. 3. Отщепление сигнального пептида от (А) FCRLA4d, (Б) FCRLA2d. Иммуноблот, окращенный антителами против FCRLA. 1 – FCRLA с длинным сигнальным пептидом из трансфицированных 293T клеток; 2 – Рекомбинантный FCRLA из E. coli (короткий неотщепленный сигнальный пептид) 3 – FCRLA с коротким сигнальным пептидом из трансфицированных 293T клеток.

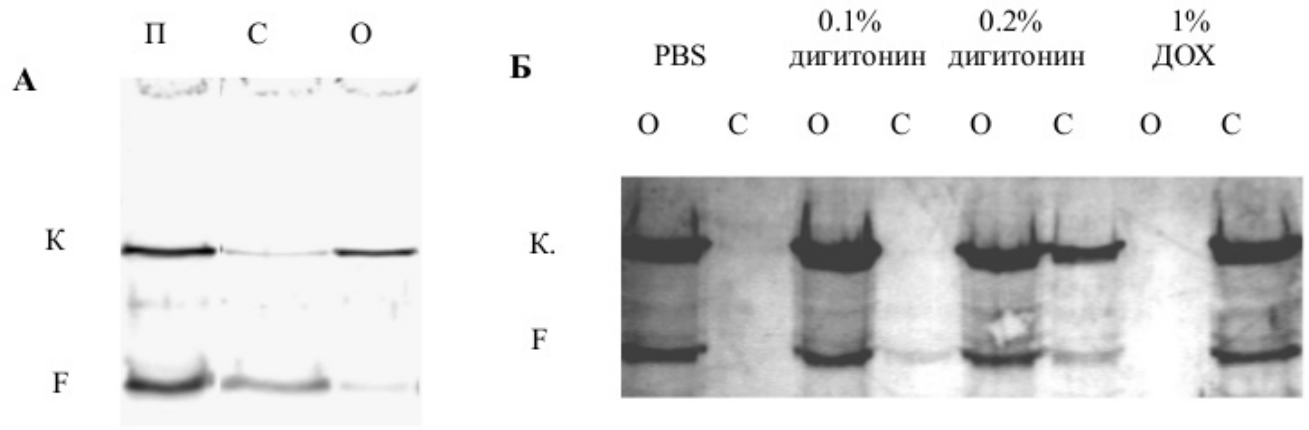


Рис. 4. Характер мембранной ассоциации FCRLA. Иммуноблот после ДСН ПААГ. Окраска антителами против FCRLA и калнексина.

А. Микросомы Bjab были обработаны карбонатным буфером pH 11,5, после этого подвергнуты ультрацентрифугированию. FCRLA (F), большей частью, остается в супернатанте (С), калнексин (К) переходит в осадок (О). (П) – микросомы без ультрацентрифугирования.

Б. Инкубация микросом Bjab с различными детергентами или без детергентов. После инкубации лизат центрифугировали и анализировали осадок (О) и супернатант (С). Видно, что FCRLA (F) начинает переходить в растворимую фракцию уже при 0,1 % дигитонина.

Характер взаимодействия четырехдоменной изоформы FCRLA с мембраной ЭР.

FCRLA, согласно результатам щелочной экстракции, не является интегральным мемранным белком, а с другой стороны, при обработке микросом дигитонином, большей частью остается связанным с мембранной фракцией (Рис. 4). Из этого можно сделать вывод, что FCRLA является мембранно-ассоциированным белком.

Анализ чувствительности FCRLA к протеолизу в присутствии и отсутствии детергента демонстрирует что FCRLA локализован внутри люмена ЭР.

Идентификация участка FCRLA, определяющего его локализацию в ЭР.

Приведенные выше данные позволяют утверждать, что локализация FCRLA в ЭР обусловлена не сигнальным пептидом, который отсутствует у зрелого белка. Поскольку мы показали, что FCRLA является резидентным мембранно-ассоциированным белком ЭР, локализованным целиком внутри люмена, его локализация внутри ЭР должна быть обусловлена контактами с другими белками. Исследование того, каким образом FCRLA ассоциирует с интегральными белками ЭР принципиально как для функционального анализа изоформ FCRLA. Для идентификации домена, ответственного за локализацию FCRLA в ЭР, нами были сконструированы три плазмиды, кодирующие делеционные варианты FCRLA с коротким сигнальным пептидом на N-конце. После трансфекции этих конструкций в 293 Т клетки проводили анализ супернатантов кондиционированных сред трансфектантов на наличие секретируемого FCRLA (Рис. 5). Было показано, что мутантные формы, содержащие все домены кроме первого, секретировались. Таким образом, первый домен FCRLA необходим для его локализации в ЭР.

Как упоминалось ранее, N-концевой домен FCRLA содержит три

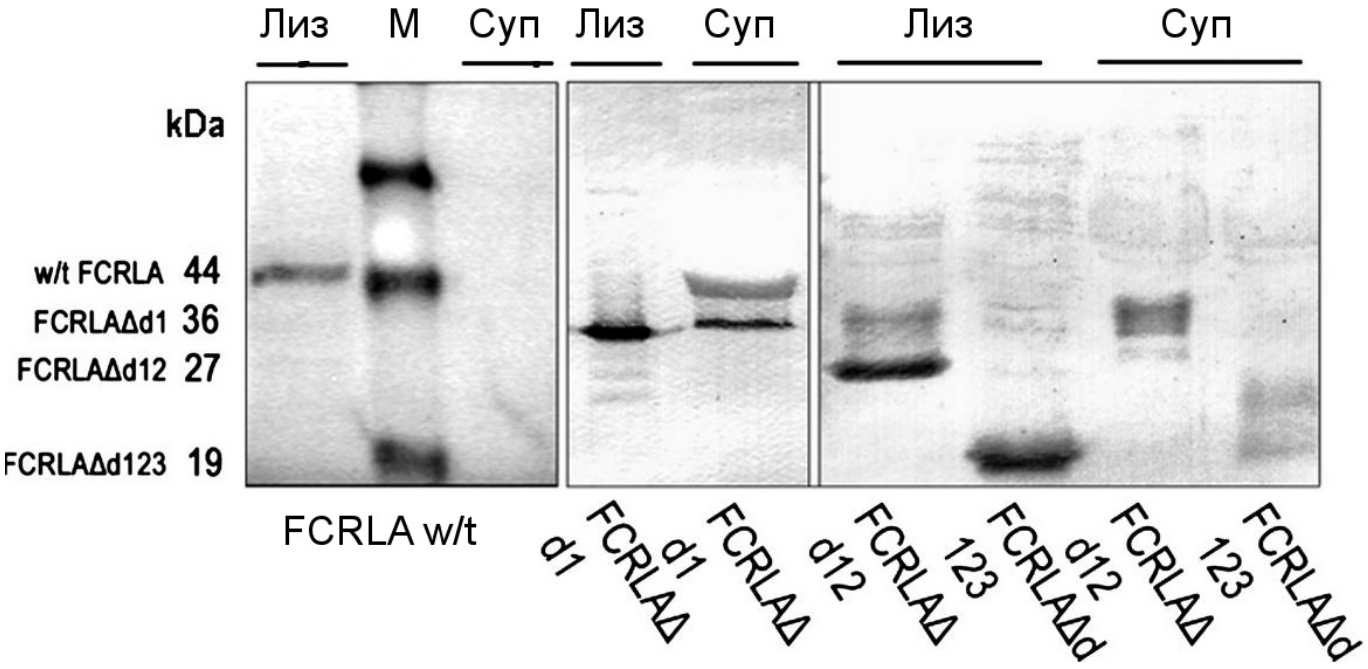


Рис. 5. Секреция изформ FCRLA без первого домена. Иммуноблот после ДСН ПААГ. Окраска поликлональными кроличьими антителами против FCRLA.
FCRLAΔd1 - изоформа FCRLA без первого N-концевого домена, FCRLAΔd12 - без двух N-концевых доменов, FCRLAΔd123 - изоформа, представленная одним последним C-концевым доменом.

цистеиновых остатка, которые расположены в мотиве cegpvcteessc. Второй и третий домены FCRLA принадлежащие к Ig-подобным доменам, содержат по два остатка цистеина, формирующих внутридоменную дисульфидную связь. С-концевой муцин-подобный домен не содержит цистеиновых остатков. Следовательно, один из трех цистеинов первого домена не формирует внутримолекулярных дисульфидных связей.
Мы предположили, что цистеиновые остатки в N-концевом домене могут определять локализацию FCRLA в ЭР, посредством образования дисульфидных связей с заякоренными белками. Для проверки этого предположения была создана конструкция, кодирующая мутантную форму FCRLA с тремя аминокислотными заменами C52G, C57G, C63G, то есть, без вышеупомянутых цистеиновых остатков. При трансфекции в 293 T клетки мутантная форма FCRLA без трех цистеинов в первом домене не секретировалась, на основании чего можно утверждать, что мутантный FCRLA также задерживается в ЭР. Таким образом, ни один из цистеиновых остатков N-концевого домена не участвует в задержке FCRLA. Следовательно, «свободный» цистеиновый остаток может играть важную роль в функционировании FCRLA, так как подобные группы часто вовлечены в процессы димеризации белков, участвуют в окислительно-восстановительных и иных реакциях.
Таким образом, причины задержки разных изоформ FCRLA в ЭР различны: четырехдоменные изоформы, которые в зрелом состоянии не содержат сигнального пептида, задерживаются в ЭР посредством N-концевого домена, причем без участия остатков цистеинов в этом процессе. Двухдоменная изоформа с коротким сигнальным пептидом

задерживается в ЭР из-за невозможности отщепить сигнальный пептид - возможно, она расценивается клеточным аппаратом как дефектная и подлежит деградации. В случае двухдоменной изоформы с длинным сигнальным пептидом, его отщепление успешно происходит, и, не имея первого «заякоревающего» домена, двухдоменный FCRLA секретируется из клетки.

Определение молекулярной массы FCRLA-содержащего комплекса.
Так как FCRLA является мембранно-ассоциированным белком, предполагается, что большая часть молекул FCRLA должна взаимодействовать с трансмембранными белками ЭР или заякоренными в мембране белковыми комплексами. Определение молекулярной массы и состава этого комплекса могло бы иметь значение для дальнейшей функциональной характеризации FCRLA.
Для определения молекулярной массы комплекса с участием FCRLA нами был выбран метод нативного синего электрофореза (НС ПААГ - Blue Native PAGE) с последующей концентрацией материала ДСН ПААГ во втором направлении. Характер расположения сигнала на электрофореграмме непрерывен в области от нескольких МДа до 140 кДа, с максимумом в области 170 кДа (Рис. 6). Аналогичная картина непрерывного распределения сигнала после двумерного (НС/ДСН ПААГ) электрофореза наблюдается для шаперонов типа BiP, а также транспортных адаптерных молекул, входящих в состав гетерогенных комплексов, таких как импортин-α или BAP29/31. Подобные непрерывные полосы свидетельствуют о взаимодействии FCRLA с различными белками.

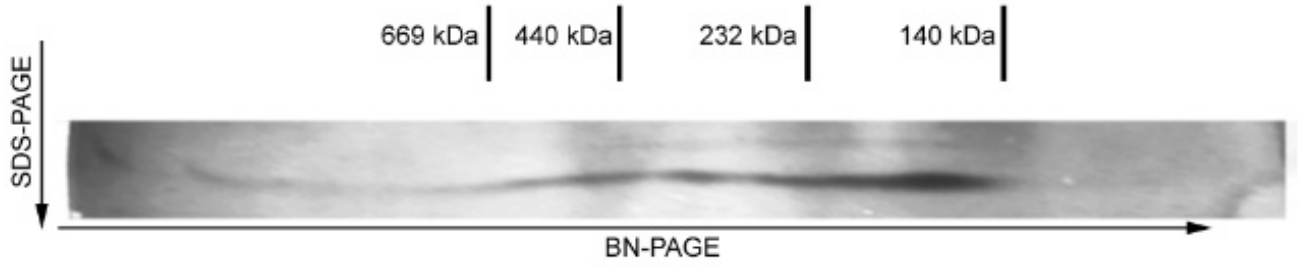


Рис. 6. Иммуноблот двумерного электрофореза, окрашеный антителами против FCRLA. Первое измерение – BN-PAGE в градиентном геле 3-12%, второе измерение – SDS-PAGE в 10% акриламидном геле. Вертикальными линиями отмечены маркеры молекулярного веса, использованные в BN-PAGE. Видно непрерывное распределение FCRLA-содержащих комплексов.

Взаимодействие FCRLA с иммуноглобулинами.
Поскольку, среди всего FCRL семейства, второй и третий домены FCRLA имеют наиболее высокий уровень гомологии с доменами классических Fc-рецепторов, можно было предположить, что FCRLA имеет способность к взаимодействию с иммуноглобулинами, которые продуцируются FCRLA+ клетками.Чтобы проверить это предположение нами была проведена реципрокная аффинная хроматография лизата микросом из клеток миндалины человека сорбентами с антителами к IgM и FCRLA. Было обнаружено, что FCRLA извлекается антителами против IgM (Рис. 7), а μ-цепь IgM, в свою очередь, обнаруживается в элюатах с сорбента с анти-FCRLA антителами (Рис. 7). Таким образом, некоторая часть молекул FCRLA взаимодейтсвует с μ-цепью IgM в эндоплазматическом ретикулуме. То, что сорбентом против IgM извлекается небольшое количество FCRLA, можно объяснить значительным избытком IgM в ЭР, по сравнению с FCRLA. Вследствие избытка, даже при взаимодействии всех молекул FCRLA с IgM, большая часть молекул IgM остается свободной, и, при аффинном извлечении из лизата, не несет FCRLA.
Нам не удалось зафиксировать никакого взаимодействия между FCRLA и IgM, равно как и IgG, в случае если иммуноглобулины были иммобилизованы на сорбенте, а лизат клеток с FCRLA инкубировался с сорбентом в различных условиях. Кроме того, мы не обнаружили взаимодействия и секретируемой двухдоменной изоформы FCRLA с иммуноглобулинами. Таким образом, выявленное нами взаимодействие FCRLA с μ-цепью, вероятно, носит характер транзитного и является весьма требовательным к биохимическому окружению. Известны случаи, когда взаимодействие белков происходит в узком диапазоне pH, окислительно-восстановительном окружении, или при участии вспомогательных низкомолекулярных лигандов.

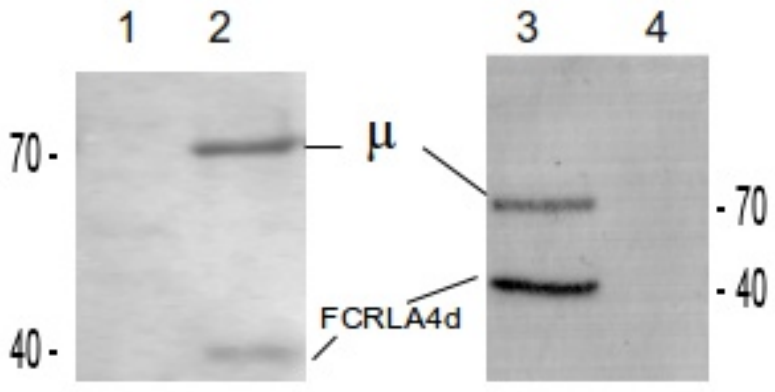


Рис. 7. Взаимодействие FCRLA с иммуноглобулинами. Иммунопреципитация лизатов клеток миндалины: антителами против IgM человека (1), антителами против FCRLA (3) или c-myc (1, 4 выступал как отрицательный контроль). Видна реципрокная копреципитация FCRLA и μ-цепи IgM.

Поиск белков, взаимодействующих с FCRLA.
Для поиска белков, взаимодействующих с FCRLA в ЭР, нами был сконструирован химерный белок FCRLA-2xStreptag-FLAG, содержащий гибкий глицин-сериновый линкер между последовательностью FCRLA и эпитопами flag и 2xStreptag. ДНК, кодирующая такой химерный белок в составе лентивирусной кассеты, была доставлена в клетки линии BJAB, и трансгенные клетки были отобраны при помощи FACS. Из лизатов трансгенных клеток FCRLA успешно извлекали при помощи анти-flag или стрептактин-сорбента. Для очистки FCRLA-содержащих комплексов мы проводили последовательно две аффинных хроматографии на анти-flag, а затем на стрептактин-сорбенте в нативных условиях. Размер комплекса после двух хроматографий оставался таким же как в лизатах клеток, что контролировалось гель-фильтрацией с последующим Вестерн-блотом.
Очищенный FCRLA-содержащий комплекс разделяли денатурирующим электрофорезом в ПААГ (Рис. 8). Затем отдельные полосы вырезали из геля и подвергали трипсинолизу. Пептиды после трипсинолиза анализировали MALDI-масспектрометрией. Основными компонентами комплекса, которые удалось идентифицировать, оказались BiP, β-цепь HLA-DR и FCRLA. Остаётся неясным, является ли присутствие BiP в комплексе с FCRLA следствием их естественного функционального взаимодействия, или мы детектируем связь BiP как шаперона с незрелым FCRLA, так как огромное количество белков проходит стадию взаимодействия с BiP в ходе их созревания.

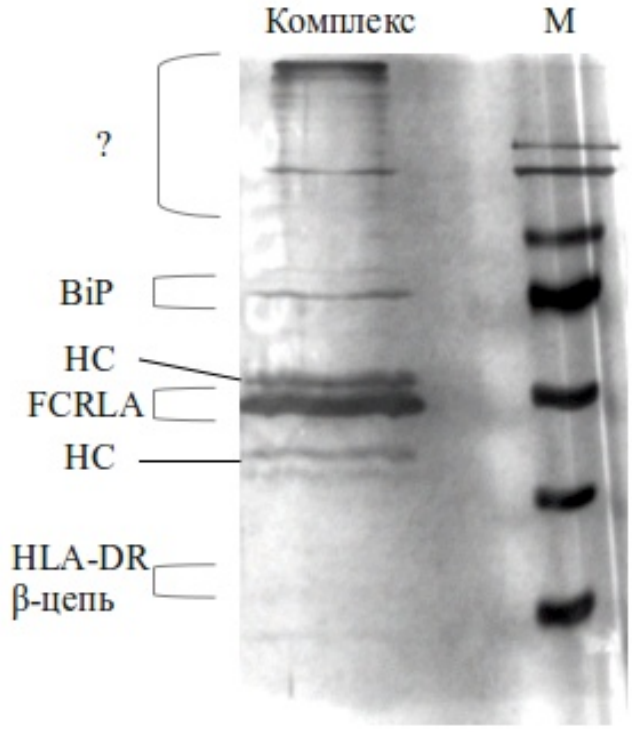


Рис. 8. Очищенный FCRLA-содержащий комплекс. Слева указаны компоненты комплекса, идентифицированные масс-спектрометрией. Происхождение высокомолекулярных полос (>200 кДа) установить не удалось. HC – неспецифически связавшиеся при хроматографиях белки: прохибитин и PRDM5.

В результате проделанной нами работы было показано, что основная изоформа FCRLA представляет собой резидентный белок ЭР. Ориентирован FCRLA внутрилюменально и является мембранно-ассоциированным белком. Эти данные важны для функциональной характеристики FCRLA, так как они естественным образом ограничивают эндоплазматическим ретикулумом круг процессов с его участием. Отличительными особенностями эндоплазматического ретикулума В-клеток является, во-первых, его способность к быстрой экспансии при дифференцировке В-лимфоцитов в плазматические клетки, во-вторых, сложная система регуляции секреции и деградации иммуноглобулинов.
Нами было показано, что FCRLA существует в клетке в составе высокомолекулярного комплекса. Мы обнаружили взаимодействие некоторой доли FCRLA с μ-цепью IgM. В ходе поиска белков, ассоциированных с FCRLA, мы обнаружили, что он взаимодействует с BiP и HLA-DR, однако функциональное значение подобной связи требует дополнительного анализа.
Дифференцировка В-клетки в плазматическую по времени занимает всего лишь несколько дней, однако за это время клетка успевает значительно изменить машину белкового синтеза/секреции. Для того чтобы такая перестройка не привела к гибели клетки требуется хорошо скоординированная работа многих систем, в том числе, таких как UPR и ERAD. По мере изучения этих систем описываются все новые и новые белки, осуществляющие контроль и регуляцию процессов экспансии ЭР и усиления синтеза/секреции иммуноглобулинов. Исходя из полученных нами данных, можно выдвинуть предположение, что FCRLA участвует в процессах регуляции синтеза/секреции иммуноглобулинов и контроля UPR в В-клетках и на ранних стадиях их дифференцировки в плазматические клетки. Вероятно, FCRLA не взаимодействует с IgM напрямую, так как их количество в клетке слишком отличается, однако FCRLA может выступать в роли сигнальной молекулы, опосредованно координирующей синтез/секрецию и развитие UPR.
Это предположение подкрепляется профилем экспрессии FCRLA человека, который продуцируется зрелыми В-лимфоцитами, но не плазматическими и наивными клетками. В плазматических клетках IgM интенсивно секретируется, поэтому нет необходимости в системе его активной задержки. В наивных В-лимфоцитах синтез IgM находится на очень низком уровне, что также не требует его задержки. В зрелых активированных В-лимфоцитах IgM синтезируется на значительном уровне, чтобы обеспечить возможность быстрой дифференцировки в плазматическую клетку, при этом секреция IgM за пределы лимфоцита крайне нежелательна, так как возле клеточной поверхности свободный IgM будет вступать в конкуренцию за антиген с трансмембранными рецепторами, снижая активационный сигнал. Именно в эту систему задержки и деградации секреторного IgM и может быть вовлечён FCRLA. Дополнительным фактом, свидетельствующим в пользу предположения о роли FCRLA в процессах задержки транзитных молекул ЭР, является его локализация на экстраплазматической стороне мембраны ЭР, что характерно для многих транспортёров и молекул систем задержки (TAP, калнексин, KDEL-рецептор и проч.)

Изучение сигнальных свойств FCRL6 на модели in vitro.

Изучение сигнальных свойств рецептора является необходимым и наиболее очевидным этапом его исследования. На момент начала работ по изучению функциональных свойств FCRL6 сведений об этом рецепторе практически не имелось. В цитоплазматической части FCRL6 расположены два ITIM-подобных мотива, однако связывают ли они сигнальные белки было неизвестно.

Воспользовавшись подходом "GST-PullDown", мы провели анализ связывания сигнальных молекул с цитоплазматической областью FCRL6. Для анализа влияния индивидуальных остатков тирозинов в ITIM-мотивах FCRL6 М. В. Мамонкиным и А. М. Наякшиным были сделаны конструкции, кодирующие химерные белки GST-цитоплазматическая область FCRL6, как дикого типа, так и с точечными заменами Y356F и Y371F. Рекомбинантные белки, были выделены и проинкубированы с лизатами клеток Jurkat в присутствии ингибиторов фосфатаз и протеаз. Полученные результаты позволяют судить о связывании сигнальных белков с каждым из ITIM-мотивов в отдельности, равно как и с цитоплазматической областью в целом (Рис. 9). Можно видеть, что с цитоплазматической областью FCRL6 связываются сигнальные фосфатазы SHP-1, SHP-2, SHIP-1, SHIP-2 и адаптерный белок Grb2. Белки Syk, Zap-70 и PKD2 не связываются. При этом, остаток тирозина в положении 371 является необходимым для связывания SHP-1 и SHP-2, тогда как остаток тирозина в положении 356 необходим для связывания SHIP-1. SHIP-2 связывается с цитоплазматической областью FCRL6 только в присутствии обоих остатков тирозина. Таким образом, оба ITIM-мотива в цитоплазматической части FCRL6 являются значимыми для взаимодействия с сигнальными белками.

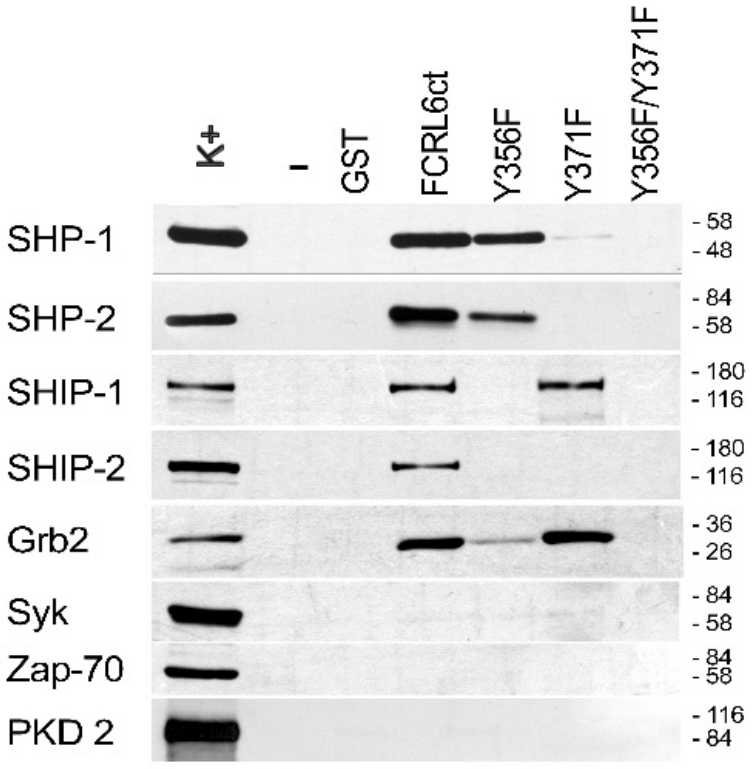


Рис. 9. Взаимодействие рекомбинантной цитоплазматической области FCRL6 с различными сигнальными белками. K+ положительный контроль, которым выступал лизат клеток Jurkat, GST – отрицательный контроль, FCRL6ct - FCRL6 дикого типа. Три правых полосы соответствуют белкам FCRL6 с точечными заменами, указанными сверху.

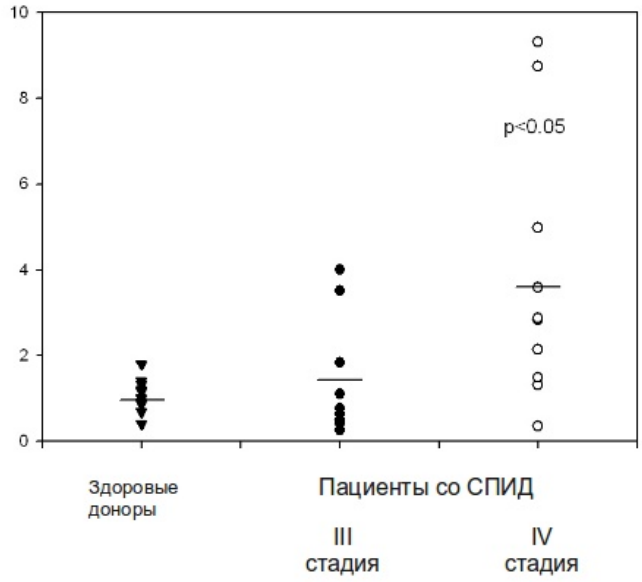


Рис. 10. Экспрессия FCRL6 достоверно увеличивается у больных с IV стадией СПИД. Каждая точка на графике отражает уровень экспрессии FCRL6 в ПМКК донора или пациента. За единицу принят средний уровень экспрессии FCRL6 у здоровых доноров.

Экспрессия FCRL6 при ВИЧ инфекции.

Полученные нами сведения о сигнальных свойствах FCRL6 указывают на ингибирующую природу его воздействия на клетку. Ранее в лаборатории были получены данные об отсутствии экспрессии FCRL6 в in vitro активированных мононуклеарных клетках крови, и сниженной экспрессии FCRL6 в CD8+ клетках больных некоторыми аутоиммунными заболеваниями. Таким образом, экспрессия FCRL6 нехарактерна для активированных клеток. Мы предположили, что уровень экспрессии FCRL6 может быть связан с уровнем функциональной активности ЦТЛ. Чтобы проверить это предположение мы изучили экспрессию FCRL6 в лимфоцитах ВИЧ-инфицированных больных. Хроническая ВИЧ-инфекция представляет собой классический пример дисфункции иммунной системы, которая вызвана истощением вирус-специфических ЦТЛ. В настоящее время известно несколько ингибирующих рецепторов, экспрессия которых коррелирует со степенью истощенности цитотоксических клеток.

Мы провели количественный ПЦР с кДНК образцов периферических мононуклеарных клеток крови здоровых доноров и больных СПИДом (отбор крови у ВИЧ-инфицированных доноров и выделение лейкоцитов было произведено специалистами ГУ Новосибирский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями). Как видно из рисунка 10 экспрессия FCRL6 возрастает у больных СПИДом на III и, в особенности, на IV стадии развития заболевания. Более того, средняя экспрессия FCRL6 в ПМКК больных СПИДом на IV стадии достоверно ($p<0.05$) выше таковой у здоровых доноров и больных на III стадии развития заболевания.

В дальнейшем мы исследовали экспрессию FCRL6 на отдельных субпопуляциях лимфоцитов ВИЧ-инфицированных больных. Как следует из рисунка (Рис. 11, левая часть) в норме FCRL6 экспрессируется на 2-5% мононуклеарных клеток периферической крови. Эти клетки представлены цитотоксическими Т лимфоцитами (ЦТЛ, CD8+) и натуральными

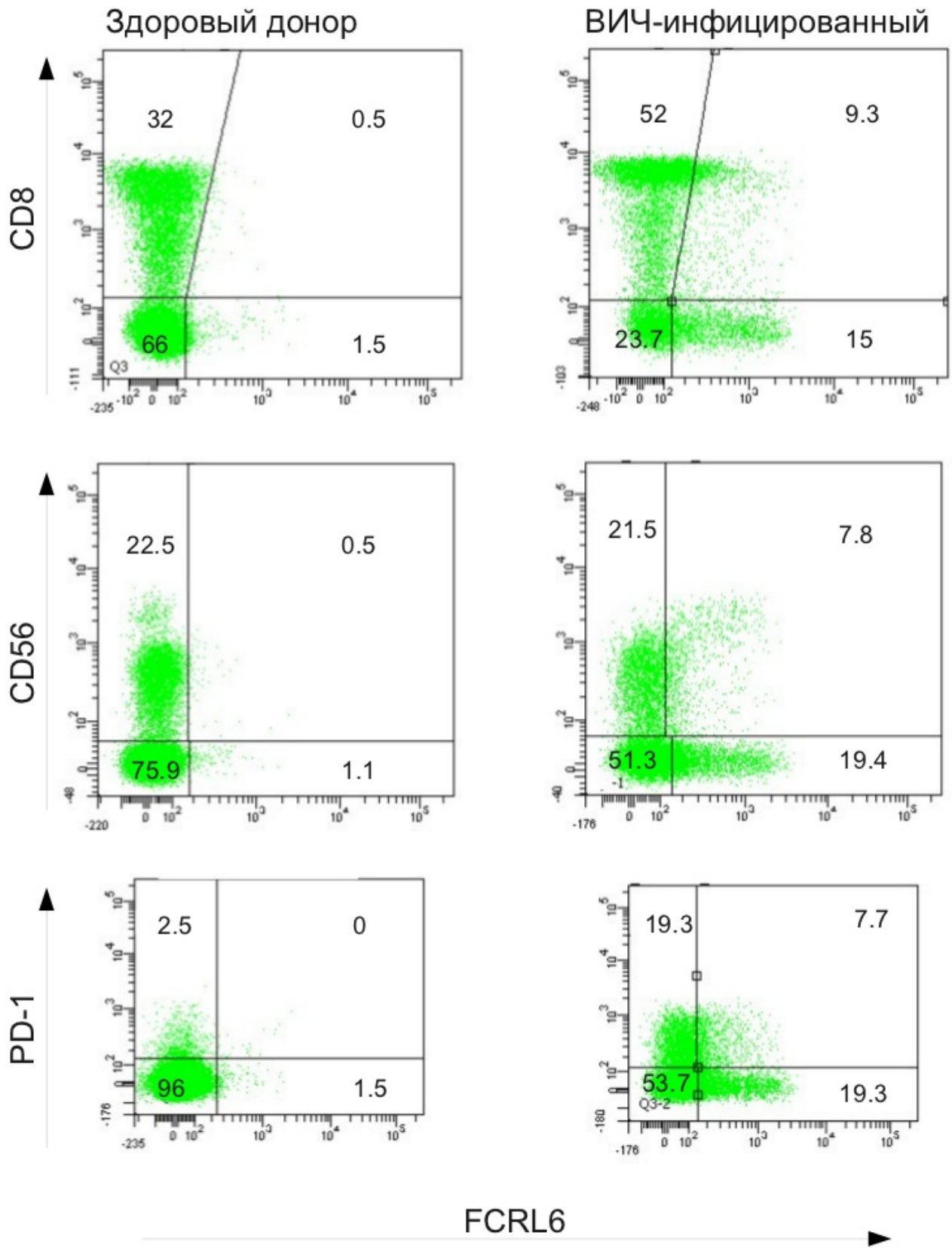


Рис. 11. Анализ поверхностной экспрессии FCRL6 на лимфоцитах человека в норме и при патологии. Доля FCRL6+ клеток значительно возрастает при ВИЧ-инфекции. Заметно повышение доли FCRL6+ клеток более чем на порядок среди лимфоцитов с фенотипами CD8+ (Т-киллеры) и CD56+ (NK-клетки). Кроме того, FCRL6+ начинает коэкспрессироваться с PD-1, чего в норме не происходит.

киллерами (NK-клетки, CD56+). У здоровых доноров практически не обнаруживается экспрессия FCRL6 на других типах клеток, кроме того, FCRL6+ клетки не коэкспрессируют PD-1. Для анализа экспрессии FCRL6 у ВИЧ-инфицированных больных мы воспользовались сформированной ранее в лаборатории коллекцией образцов лимфоцитов периферической крови от пациентов с диагнозом СПИД различных стадий. Мы исследовали экспрессию FCRL6 и фенотип FCRL6+ клеток у 13 первичных пациентов с вирусной нагрузкой от 50 000 копий мРНК/мл до 9 000 000 копий мРНК ВИЧ на мл плазмы (на момент взятия материала). Из Рис. 11 можно видеть, что у ВИЧ-инфицированных пациентов значительно возрастает доля FCRL6+ ЦТЛ клеток, достигая 10% от общего числа лимфоцитов. Количество NK-клеток экспрессирующих FCRL6 также на порядок повышается достигая 5-8% от общего числа лимфоцитов и трети от всех CD56+ клеток. При этом, среди субпопуяций CD56+ клеток коэкспрессия FCRL6 распределена неравномерно: CD56hi клетки значительно чаще являются FCRL6-положительными чем CD56low. Как известно, CD56hi NK-клетки проявляют меньшую цитотоксичность чем CD56low лимфоциты, при этом первые характеризуются более активной секрецией активирующих цитокинов. Чем обусловлен такой паттерн экспрессии FCRL6 у NK-клеток неясно, однако известно о возниконовении дисбаланса между долей CD56hi/CD56low клеток при развитии СПИДа.

Наряду с повышенной экспрессией PD-1 у ВИЧ-инфицированных больных, можно отметить коэкспрессию PD-1 и FCRL6. PD1+FCRL6+ клетки могут нести фенотип как CD8+, так и CD56+. При этом большая часть FCRL6+ клеток не экспрессирует PD1. Интересным является тот факт, что уровни экспансии FCRL6 и PD-1 на цитотоксических клетках не имеет достоверно значимой корреляции. Таким образом, PD-1 и FCRL6, с большой вероятностью, маркируют разные типы клеточного истощения.

Известно, что одним из наиболее достоверных маркеров степени тяжести ВИЧ-инфекции является количество CD4+ клеток в крови больных.

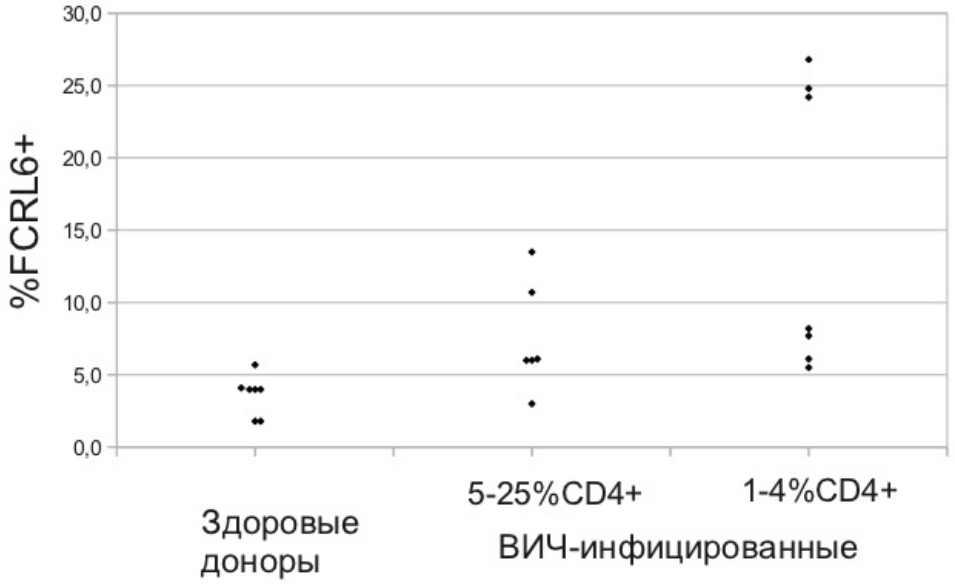


Рис. 12. Количество FCRL6+ клеток связано с долей CD4+ лимфоцитов в крови донора. По мере развития ВИЧ-инфекции, доля CD4+ лимфоцитов снижается, а процент FCRL6+ клеток пропорционально возрастает.

Основываясь именно на этом показателе ВОЗ рекомендует оценивать стадию СПИДа и эффективность проводимой антиретровирусной терапии (рекомендации ВОЗ по терапии СПИД, 2013). Исходя из предположения, что FCRL6 может быть маркером истощения цитотоксических клеток, мы проверили связь количества FCRL6+ клеток и доли CD4+ клеток. Корреляционный анализ методом Спирмена выявил отрицательную корреляцию между количеством CD4+ клеток и долей FCRL6+ клеток с коэффициентом -0.61 ($p<0.001$). Как видно из рисунка 12, прослеживается обратная зависимость между процентом CD4+ клеток в крови и экспрессией FCRL6.

Таким образом, по мере прогрессирования ВИЧ-инфекции, и, соответственно, увеличения числа истощенных цитотоксических клеток, пропорционально увеличивается и число FCRL6+ клеток. Это позволяет предполагать, что FCRL6 может являться новым маркером клеточного истощения. Особенный интерес представляет тот факт, что паттерн экспрессии FCRL6 на цитотоксических клетках в значительной степени не совпадает с таковым у PD-1. Возможно, это означает, что экспрессия FCRL6 свойственна особой субпопуляции истощенных клеток. Остается неясным, является ли повышение экспрессии FCRL6 одной из причин развития истощения ЦТЛ (как в случае с PD-1) или это только следствие функциональных изменений в клетке, вызванных сигналами от других рецепторов.

Недавно группой R. Davis было установлено, что лигандом FCRL6 является HLA-DR, молекула класса MHC II. Учитывая эти данные, можно предположить, что биологический смысл FCRL6 заключается в отрицательной регуляции активности ЦТЛ при их контакте с HLA-DR несущими клетками, такими как B-клетки и дендритные клетки. Возможно, это необходимо для того, чтобы предотвращать гиперактивацию Т-клеток при их множественных контактах с антиген-презентирующими клеткми во время хронических инфекций.

Обнаруженная нами отрицательная корреляция между уровнем экспрессии FCRL6 и количеством CD4+ клеток у больных ВИЧ-инфекцией требует дополнительного изучения, и, в перспективе, может сделать FCRL6 новым прогностическим маркером тяжести СПИДа.

Выводы

1. FCRLA человека продуцируется в виде семи изоформ, отличающихся длиной сигнального пептида (короткий или длинный), доменным составом (от одного до четырех доменов) и локализацией (внутриклеточный или секретируемый белок).

2. Основная изоформа FCRLA в тканях человека состоит из 4-х доменов и имеет короткий сигнальный пептид, кодируемый одним экзоном. Эта изоформа является резидентным фактором эндоплазматического ретикулума В-лимфоцитов. Она ориентирована внутрилюменально и принадлежит к типу мембранно-ассоциированных белков ЭР.

3. Задержка 4-х доменной изоформы FCRLA в эндоплазматическом ретикулуме обусловлена наличием N-концевого домена. Изменение длины сигнального пептида не влияет на локализацию 4-х доменной изоформы. Изоформы FCRLA, лишенные N-концевого домена, секретируются при условии отщепления сигнального пептида.

4. Молекулы FCRLA включены в состав высокомолекулярных комплексов в клетках В-лимфоцитарных линий. При помощи иммунопреципитации показано, что нативный или таг-модифицированный FCRLA находится в составе комплексов с тяжелой μ-цепью IgM, шапероном BiP и β-цепью молекулы MHC II класса HLA-DR.

5. FCRL6 является ингибирующим рецептором. Фосфорилированные остатки тирозина в цитоплазматическом участке FCRL6 способны связывать внутриклеточные тирозинфосфатазы. Фосфорилированный Tyr356 необходим для связывания SHIP-1 и SHIP-2, а Tyr371 – для связывания SHP-1, SHP-2 и SHIP-2.

6. Показана отрицательная корреляция между количеством CD4+ Т-лимфоцитов и уровнем экспрессии FCRL6 у ВИЧ-инфицированных больных.

Список публикаций по теме диссертационной работы

1. **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.
2. Santiago T., **Kulemzin S.V.**, Reshetnikova E.S., Chikaev N.A., Volkova O.Y., Mechetina L.V., Zhao M., Davis R.S., Taranin A.V., Najakshin A.M., Hendershot L.M., Burrows P.D. FCRLA is a resident endoplasmic reticulum protein that associates with intracellular Igs, IgM, IgG and IgA // Int Immunol. 2011. V.23. P.43-53.
3. **Kulemzin S**., Chikaev N., Volkova O., Reshetnikova E., Taranin A., Najakshin A., Mechetina L. Characterization of human FCRLA isoforms // Immunol Lett. 2013. V.152. P.153-158.

Тезисы:
4. Reshetnikiova E., **Kulemzin S.**, Mechetina L., Volkova O., Chikaev N., Taranin A., Najakshin A. FCRLA is an ER-resident protein differentially expressed in T cell-dependent and T-cell independent immune responses // Eur. J. Immunol. - Proceedings of 2nd European Congress of Immunology. Berlin, Germany, September 2009.
5. Mechetina L.V., Najakshin A.M., Chikaev N.A., Volkova O.Y., Reshetnikova E.S., **Kulemzin S.V.**, Kleijmeer M., Hendershot L.M., Burrows P.D., and Taranin A.V. FCRLA is an ER-resident protein interacting with the secreted form of IgM. // Keystone Symposia "Biology of B cells in health and disease", 2007, Abstract book, p.96.
6. Таранин А.В., Наякшин А.М., Мечетина Л.В., Волкова О.Ю., Чикаев Н.А., Гусельников С.В, Баранов К.О., Решетникова Е.С., **Кулемзин С.В.** FcR-подобные белки // Сборник тезисов конференции "Фундаментальные науки - медицине", 2-5 сентября 2008, Новосибирск
7. **Кулемзин С.В.**, Файнгерц С.А., Мечетина Л.В., Чикаев Н.А, Шевелев А.Я., Пекло М.М., Власик Т.Н., Карпенко Л.И., Ильичев А.А., Наякшин А.М., Таранин А.В. Экспрессия рецептора лимфоцитов человека FCRL6 в норме и при иммунопатологиях // Матер. объединенного иммунологического форума 2008. Санкт-Петербург, 2008 г. Росс. иммунологический журнал. 2008. 2(11). С. 122.