

УДК 577.2:571.27

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *FCRL1* ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

© 2012 г. К. О. Баранов^{1*}, О. Ю. Волкова¹, Л. В. Мечетина¹, Н. А. Чикаев¹, Е. С. Решетникова¹, Г. М. Никулина², А. В. Таранин¹, А. М. Наякшин¹

¹Отдел молекулярной и клеточной биологии Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090

²Центральная клиническая больница Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090

Поступила в редакцию 20.04.2011 г.

Принята к печати 19.07.2011 г.

В представленной работе сравнивали экспрессию гена *FCRL1*, кодирующего рецептор В-клеток человека, в норме и при аутоиммунных заболеваниях. С этой целью использовали результаты дот-гибридизации ДНК на мембранах, содержащих образцы кДНК из субпопуляций клеток крови больных с аутоиммунной патологией. Количественная оценка гибридных сигналов показала, что уровень экспрессии гена *FCRL1* в В-лимфоцитах периферической крови у больных рассеянным склерозом, антифосфолипидным синдромом, артериитом Такаясу, а также болезнью Виллебранда значительно выше, чем у здоровых индивидов. Получены моно- и поликлональные антитела, позволяющие выявлять *FCRL1* методами иммуноблоттинга, проточной цитометрии и иммуногистохимического окрашивания. Обнаружено, что *FCRL1* представлен на поверхности зрелых CD19+ В-клеток. В миндалинах *FCRL1*-позитивные клетки располагаются в области крипт: в мантии вторичных лимфоидных фолликулов и среди клеток лимфоидного эпителия. *FCRL1*-продуцирующие клетки обнаружены также в В-клеточных фолликулах селезенки.

Ключевые слова: В-клетки, FCRL-семейство, аутоиммунные заболевания, моноклональные антитела, иммуногистохимический анализ, проточная цитометрия.

EXPRESSION OF HUMAN B-CELL SPECIFIC RECEPTOR FCRL1 IN NORMAL INDIVIDUALS AND IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNE DISEASES, by K. O. Baranov^{1*}, O. Yu. Volkova¹, L. V. Mechetina¹, N. A. Chikaev¹, E. S. Reshetnikova¹, G. M. Nikulina², A. V. Tarantin¹, A. M. Najakshin¹ (¹Department of Molecular and Cellular Biology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia; *e-mail: baranov@mcb.nsc.ru; ²Central Clinical Hospital, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia). The comparative analysis of expression level of *FCRL1* gene encoding human B-cell surface receptor in healthy individuals and patients with autoimmune diseases was carried out. For the expression estimation we used results of DNA dot-hybridization on the membranes, containing cDNA samples from subpopulations of blood cells of patients with autoimmune diseases. The quantitative estimation of hybridization signals showed that expression level of *FCRL1* gene in peripheral blood B-lymphocytes was significantly higher in patients with a multiple sclerosis, lupus anticoagulans, Takayasu's arteritis and also in von Willebrand disease than in healthy individuals. *FCRL1*-specific monoclonal and polyclonal antibodies were raised. They were proven to detect *FCRL1* in Western blotting, immunohistochemistry and flow cytometry. It was found that *FCRL1* is expressed on the surface of CD19+ mature B-cells. In tonsil *FCRL1*-positive cells were located in crypt area: in mantle zone of secondary lymphoid follicles and among cells of lymphoepithelium. *FCRL1*-positive cells were also found in B-cell follicles of the spleen.

Keywords: B-cells, FCRL-family, autoimmune diseases, monoclonal antibody, immunohistochemistry, flow cytometry.

ВВЕДЕНИЕ

В-клетки — ключевые элементы иммунной системы. Они обеспечивают поддержание иммун-

ного гомеостаза за счет таких функций, как выработка антител, органогенез вторичных лимфоидных органов, презентация антигенов и регуляция

Принятые сокращения: FCRL — FcR-подобный рецептор, МКА — моноклональные антитела.

* Эл. почта: baranov@mcb.nsc.ru

активности других клеток иммунной системы [1]. Нарушение функций В-лимфоцитов неизбежно приводит к развитию либо иммунодефицита, либо аутоиммунных патологий [2, 3]. Специализированная функциональная активность В-лимфоцитов определяется большой группой поверхностных рецепторов, ответственных за распознавание антигенов, связывание цитокинов, взаимодействие с другими клетками организма, а также за транспорт клеток [4, 5]. Роль некоторых рецепторов хорошо изучена, роль других остается неизвестной. К последним относятся рецепторы FCRL-семейства (FcR-like), идентифицированного относительно недавно. У человека *FCRL*-семейство включает восемь генов [6, 7]. Семь из них, *FCRLA*, *FCRLB*, *FCRL1*, *FCRL2*, *FCRL3*, *FCRL4* и *FCRL5*, экспрессируются преимущественно в В-лимфоцитах. *FCRLA* и *FCRLB* – это внутриклеточные белки [8–11], остальные – поверхностные трансмембранные гликопротеины типа I [12–18]. Цитоплазматические участки *FCRL1*–*FCRL5* включают тирозин-содержащие ITAM- и ITIM-подобные мотивы, взаимодействующие с внутриклеточными сигнальными белками [19, 20]. Не вызывает сомнения, что эти рецепторы участвуют в регуляции активности В-лимфоцитов. В частности, обнаружено, что мутация 169СТ в промоторном районе гена *FCRL3* ассоциирована с рядом аутоиммунных заболеваний [21]. Эта мутация приводит к увеличению экспрессии гена *FCRL3*. У больных хроническим лимфоцитарным лейкозом существенно изменен уровень поверхностной экспрессии *FCRL2* [22]. Однако биологический смысл этих отклонений неизвестен. Лиганды белков FCRL-семейства и, соответственно, их точные функции пока не определены. Ограниченными остаются и данные об экспрессии генов большинства членов этого семейства.

Основная цель нашей работы состояла в изучении *FCRL1*. Экспрессия гена *FCRL1* ограничена В-лимфоцитами и варьирует в ходе их дифференцировки [23]. Известно, что продукция *FCRL1* увеличена в некоторых В-клеточных лимфомах человека [22, 24], тогда как информация о биохимических свойствах *FCRL1* и его тканевом распределении отсутствует. Внутриклеточная область этого белка содержит ITAM-подобный мотив и обладает активирующим потенциалом [23], однако неизвестно, может ли он играть какую-либо роль в аутоиммунных патологиях. Мы получили поли- и моноклональные антитела (МКА) к *FCRL1* и с их помощью проанализировали экспрессию *FCRL1* в трансфицированных клетках и тканях человека, а также оценили ее уровень при некоторых аутоиммунных заболеваниях человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дот-гибридизация кДНК мембран с радиоактивно меченными зондами. Мембраны Multiple Tissue Expression Array (“Clontech”, США) с нормированными образцами кДНК из тканей и клеток человека гибридовали при 55–65°C в течение 12–18 ч в 10 мл раствора, содержащего 10% декстрансульфата, 5× раствор Денхарда (0.1% фикола, 0.1% сывороточного альбумина крупного рогатого скота (BSA), 0.1% поливинилпирролидона), 6× SSC, 0.5% додецилсульфата натрия (SDS) и 1 мг денатурированной ДНК из спермы лосося. Для гибридизации использовали меченный [α -³²P] *FCRL1*-зонд размером 510 п.н., соответствующий цитоплазматическому и 3'-нетранслируемому участку *FCRL1*. Зонд отмывали в 2× SSC, 1% SDS (3 раза по 20 мин), 0.1× SSC, 0.5% SDS при 55–65°C (2 раза по 20 мин). Гибридизацию мембраны Autoimmune Disease Profiling Array (“Clontech”, США) с образцами кДНК из разных субпопуляций клеток крови больных с аутоиммунными патологиями проводили в тех же условиях. Для количественной оценки сигнала использовали программу Gel-Pro Analyzer v3.1.

Получение и очистка рекомбинантного белка *FCRL1*-His. Фрагмент, кодирующий внеклеточную область *FCRL1*, амплифицировали с использованием праймеров (“MWG Biotech”, Германия): 5'-atacatatggctagcccagtgaccctgacg-3' и 5'-atactcgagcgcctgactgcgctgggc-3'. Амплифицированный фрагмент клонировали по сайтам *FauNDI* и *XhoI* в вектор pET-21b (“Novagen”, США). Синтез белка в клетках *Escherichia coli* индуцировали изопропил- β -D-тиогаллактозидом (ИПТГ). Рекомбинантный белок выделяли на колонке с Ni-NTA-сэфарозой (“Qiagen”, США) в денатурирующих условиях согласно рекомендациям производителя. Образцы лизатов клеток *E. coli* и препаратов очищенного *FCRL1*-His разделяли электрофорезом в 12%-м полиакриламидном геле (ПААГ) в восстанавливающих условиях [25]. Иммуноблоттинг проводили как описано ранее [8].

Получение поликлональных и моноклональных антител. Поликлональные антитела к *FCRL1* получали иммунизацией кроликов конъюгатами BSA с *FCRL1*-пептидами – P1 (CNLQSKTQRSLTAEYEIPSVRES) и P2 (CSLDIYSRLRKANITDVDYEDA). *FCRL1*-специфичные антитела выделяли из антисывороток на сорбентах с пептидами P1 и P2. МКА против *FCRL1* получали согласно схеме, описанной ранее [26]. Мышей линии BALB/c иммунизировали рекомбинантным белком *FCRL1*-His. В качестве антигена для скрининга использовали *FCRL1*-His, растворенный в 0.5 М гуанидингидрохлориде (“Fluka”, Швеция). Для контроля неспецифического связывания использовали суммарный лизат клеток

E. coli (10^5 клеток/лунка) вместо очищенного FCRL1-His.

Ферментативное дегликозилирование FCRL1 проводили на лизатах FCRL1-трансфицированных клеток с использованием коммерческого набора GlycoPro Enzymatic Deglycosylation Kit (“Prozyme”, США) согласно рекомендациям производителя. Белок FCRL1 выявляли методом иммуноблотинга с использованием очищенных кроличьих антител против пептида P2 FCRL1.

Иммуногистохимический анализ. Криосрезы миндалина человека, полученной в результате плановой тонзилэктомии (ЦКБ СО РАН, Новосибирск), готовили на криостате HM505N (“Mingrom”, Германия). Криосрезы помещали на предметные стекла и фиксировали холодным ацетоном. Дальнейшие этапы окрашивания проводили согласно описанной ранее схеме [26] с использованием полученных нами МКА к FCRL1 (клон K23) и козьих антител к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (“Sigma”, США). Препараты анализировали на микроскопе Axioscop2 plus (“Carl Zeiss”, Германия). Микрочип из криосрезом тканей взрослого здорового человека (“Biochain”, США) окрашивали согласно рекомендациями производителя.

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание клеток миндалина человека проводили с использованием следующих антител и конъюгатов: FITC-конъюгированные МКА против CD3 человека (клон UCNT1), FITC-конъюгированные МКА против CD19 человека (клон H1B19), PE-конъюгированные поликлональные антитела к иммуноглобулинам мыши, PE-GAM (“BD Pharmingen”, США), полученные нами МКА к FCRL1 (клон K23). Клетки вымывали из миндалина раствором фосфатно-солевого буфера (PBS) и пропускали через 70 мкМ нейлоновую сетку (“BD Pharmingen”, США), освобождаясь от крупных агрегатов. Суспензию клеток, полученную после гемолиза эритроцитов, использовали для окрашивания. Дальнейшие процедуры проводили в PBS, содержащем 0.1% NaN_3 и 1% эмбриональной сыворотки. К суспензии клеток добавляли МКА к FCRL1 в концентрации 5 мкг/мл и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. После отмывки добавляли вторые антитела в соответствующих разведениях, PE-GAM и CD3-FITC (или CD19-FITC), и инкубировали в темноте в течение 30 мин при 4°C. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSAria (“BD Biosciences”, США). Жизнеспособность клеток оценивали с использованием 7-AAD (“Sigma”, США).

Трансфекция эукариотических клеток. Клетки 293T трансфицировали плазмидой pCI-neo-FCRL1 как описано в [27].

Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического анализа Краскела—Уоллиса (Kruskal—Wallis ANOVA) и критерия Манна—Уитни (Mann—Whitney U-критерий) для попарного сравнения групп. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принимали равным 5% ($p < 0.05$), о тенденции говорили при уровне значимости $p < 0.1$. Группы лиц с аутоиммунными заболеваниями состояли из 9—11 человек, за исключением группы больных идиопатической тромбоцитопенией, в которую вошли пять человек. Контрольная группа включала 12 здоровых доноров. Данные анализировали с использованием программы Statistica 8.0

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение моноклональных и поликлональных антител против FCRL1

Для получения МКА к FCRL1 мы использовали в качестве антигена рекомбинантный белок, содержащий внеклеточную часть рецептора и С-концевой полигистидиновый участок. Соответствующий фрагмент кДНК амплифицировали с помощью ПЦР и клонировали в плазмидный вектор pET-21b. Полученную конструкцию pET-21b-FCRL1 и исходный вектор экспрессировали в клетках *E. coli*. Синтез рекомбинантного белка FCRL1-His в клетках *E. coli* индуцировали ИПТГ. FCRL1-His с молекулярной массой 29 кДа выделяли в денатурирующих условиях с помощью хроматографии на Ni-NTA-сефарозе. Электрофоретически чистый рекомбинантный белок использовали в качестве антигена для иммунизации мышей линии BALB/c. Этот же антиген в дальнейшем применяли для скрининга гибридом. Специфическую активность сывороток, полученных после третьей иммунизации мышей, определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Титр антител в иммунных сыворотках составлял 1 : 10000—1 : 30000 (не показано).

В результате гибридизации спленоцитов иммунной мыши с клетками миеломы NS0 получили гибридные клоны K11, K23 и K32, секретирующие МКА к FCRL1. Все три МКА реагировали в ИФА с рекомбинантным белком FCRL1, но не взаимодействовали с белками *E. coli*. После процедур реклонирования клетки-продуценты специфических МКА культивировали *in vivo* в виде асцитных опухолей в мышцах линии BALB/c. Показано, что клоны K23 и K32 продуцируют МКА IgG1-изотипа, клон K11 — IgG2b-изотипа. Для дальнейшего анализа использовали клон K23. МКА K23 специфически окрашивали FCRL1 на поверхности трансфицированных клеток 293T (рис. 1a) и эффективно выявляли белок в живых и фиксированных клетках человека методами про-

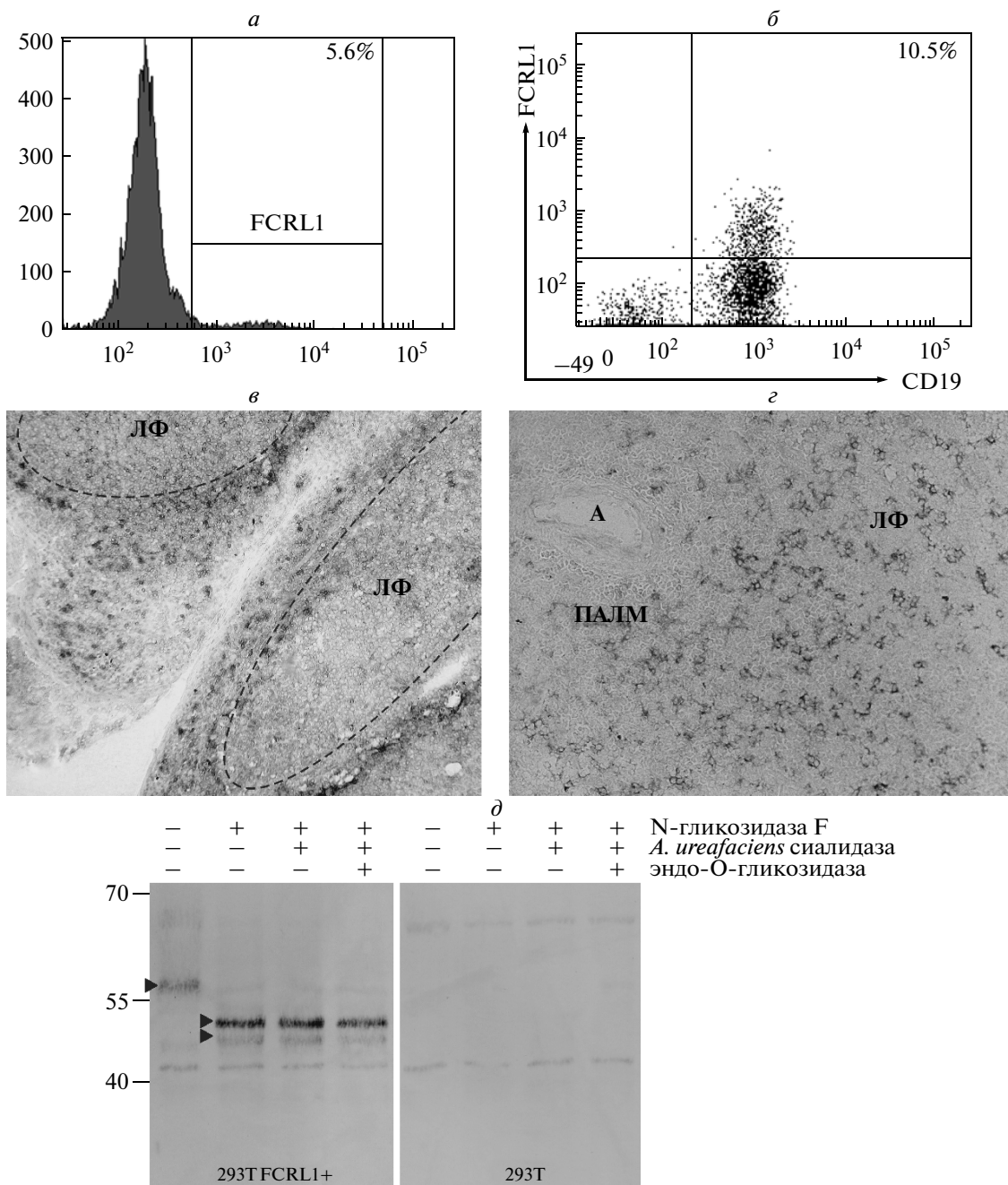


Рис. 1. FCRL1-специфичные антитела распознают на поверхности трансфицированных клеток белок с молекулярной массой 57 кДа, экспрессирующийся в миндалях и селезенке человека зрелыми CD19+ В-клетками. Цитометрический анализ клеток 293Т, трансфицированных rCI-neo-FCRL1 и окрашенных с использованием МКА K23 (а). Анализ FCRL1+ клеток в миндалях человека с помощью проточной цитометрии (б). Клетки миндаляны человека окрашивали флуоресцентно мечеными МКА, специфичными к FCRL1 и маркеру В-клеток CD19, анализировали на проточном цитофлуориметре FACSAria (“BD Biosciences”). Популяцию лимфоцитов выделяли на основании прямого и бокового светорассеяния, для исключения из анализа мертвых клеток использовали интеркалирующий ДНК-краситель 7AAD. Цифрой отмечено количество двойных окрашенных клеток (FCRL1+, CD19+) в процентах от общего числа живых лимфоцитов. Иммуногистохимическое окрашивание криосрезов миндаляны человека с использованием МКА K23 (в). Прерывистой линией отмечена граница лимфоидного фолликула (ЛФ). Окрашенные на FCRL1 клетки расположены преимущественно в мантии лимфоидного фолликула и среди клеток лимфоидного эпителия; Иммуногистохимическое окрашивание криосрезов селезенки человека с использованием МКА K23 (г). FCRL1+ клетки расположены в лимфоидном фолликуле периартериолярной лимфоидной “муфты” (ПАЛМ). А – артериола. Иммуноблоттинг лизатов клеток 293Т, нетрансфицированных (293Т) и трансфицированных плазмидой rCI-neo-FCRL1 (293Т FCRL1+), после обработки ферментами дегликозилирования (д). FCRL1 выявляли с использованием аффинно очищенных кроличьих антител против FCRL1-пептида P2 (показано стрелкой). Примерная молекулярная масса белка FCRL1 – 57 кДа. В качестве дегликозилирующих ферментов использовали N-гликозидазу, эндо-О-гликозидазу и сиалидазу *A. ureafaciens* (“+” – фермент добавлен, “-” – фермент отсутствует, FCRL1 отмечен черным треугольником). При обработке лизата трансфицированных клеток N-гликозидазой наблюдали снижение молекулярной массы приблизительно на 10 кДа.

точной цитофлуориметрии и иммуноцитохимического анализа (рис. 1б–г).

Кроме того, мы получили две поликлональные кроличьи антисыворотки против пептидов P1 (CNLQSKTQRSLTAEYEIPSVRES) и P2 (CSLDIY-SRLRKANITDVDYEDA) FCRL1. Аминокислотная последовательность, соответствующая пептиду P1, расположена между F и G β-нитями внеклеточного домена D2, а последовательность P2 взята из цитоплазматической области FCRL1 [12]. Для иммунизации пептиды P1 и P2 конъюгировали с BSA. После цикла иммунизаций антитела, специфичные к FCRL1, аффинно очищали из кроличьей сыворотки на сорбентах с иммобилизованными пептидами.

Кроличьи поликлональные антитела против пептидов FCRL1 распознавали только денатурированный белок и, соответственно, могли использоваться только для выявления FCRL1 методом иммуноблоттинга. С использованием этих антител мы впервые показали, что FCRL1 мигрирует как белок с молекулярной массой 57 кДа, что на 12 кДа превышает вычисленную массу этого белка (рис. 1д). Этот результат свидетельствует о посттрансляционной модификации FCRL1. Наиболее вероятной модификацией является N-гликозилирование трех потенциальных сайтов, локализованных в третьем домене белка. Данное предположение проверяли на лизатах клеток 293T, нетрансфицированных и трансфицированных FCRL1, которые обрабатывали дегликозилирующими ферментами. После добавления N-гликозидазы F наблюдали снижение молекулярной массы FCRL1 приблизительно на 10 кДа (рис. 1д). Дополнительная обработка лизата клеток эндо-О-гликозидазой и сиалидазой из *Arthrobacter ureafaciens* не влияла на молекулярную массу FCRL1. Эти данные указывают на то, что N-гликозилирование FCRL1 вносит основной вклад в превышение экспериментально определенной молекулярной массы FCRL1 над расчетным значением.

Экспрессия гена FCRL1 в здоровых органах и тканях

Первичный анализ экспрессии гена *FCRL1* в различных органах человека проводили с помощью дот-блот-гибридизации на мембранах Multiple Tissue Expression Array, содержащих образцы кДНК из здоровых тканей человека (рис. 2а). При гибридизации с FCRL1-зондом положительные сигналы были обнаружены преимущественно в тканях иммунной системы – селезенке, эмбриональной селезенке, лимфоузлах, костном мозге, лейкоцитах периферической крови, что соответствовало ранее полученным данным [17]. Мы обнаружили также слабую экспрессию гена в органах желудочно-кишечного тракта: желудке, среднем отделе тонкой кишки, подвздошной кишке,

илеоцекальной зоне и аппендиксе. Вероятнее всего, экспрессия *FCRL1* в этих тканях обусловлена присутствием лимфоидных клеток. Используя МКА K23 и антитела против маркеров В- и Т-клеток человека, CD19 и CD3, соответственно, и метод проточной цитофлуориметрии мы показали, что в миндалине человека FCRL1 представлен на поверхности В-лимфоцитов (рис. 1б) и отсутствует в Т-лимфоцитах (не показано). Основную популяцию FCRL1+ клеток миндалина (95–98%) составляли двойные FCRL1+/CD19+ клетки. МКА K23 не взаимодействовали с CD3+ Т-лимфоцитами. FCRL1+ клетки составляли 10–15% от CD19+ В-лимфоцитов миндалина. Эти результаты соответствуют данным, согласно которым FCRL1 представлен на В-лимфоцитах периферической крови [24].

Распределение FCRL1 в тканевых компартментах изучено нами с использованием иммуногистохимического окрашивания с помощью МКА K23 криосрезов миндалина и селезенки, а также панели криосрезов из различных тканей взрослого здорового человека. В миндалине FCRL1+ клетки локализируются преимущественно в мантии вторичных лимфоидных фолликулов (рис. 1е) и представляют собой зрелые наивные В-клетки. Особенно интересно обнаружение FCRL1+ клеток в лимфоидном эпителии крипт миндалина (рис. 1е), дополнительного лимфоидного компартмента, обеспечивающего иммунную защиту слизистой поверхности миндалин и прямую трансэпителиальную доставку антигена [28]. При окрашивании панели из криосрезов различных тканей взрослого здорового человека значительное количество FCRL1+ клеток выявляется только в селезенке (рис. 1з). Судя по расположению FCRL1+ клеток относительно артериолы, они находятся в зоне В-клеточного фолликула периартериолярной лимфоидной муфты и, как и в миндалине, являются зрелыми В-клетками. В 18 других органах (надпочечник, яичник, поджелудочная и щитовидная железа, головной мозг, легкое, матка, шейка матки, молочная железа, плацента, сердце, кожа, скелетные мышцы, почка, желудок, тонкая кишка, печень, слюнная железа) достоверного окрашивания не наблюдали. Некоторое разночтение результатов при использовании гибридизационных и гистохимических методов, скорее всего, может быть обусловлено низким уровнем белка. Так, при анализе лизатов клеток селезенки и миндалина человека методом иммуноблоттинга мы не смогли обнаружить в них FCRL1 несмотря на то, что FCRL1+ клетки составляли 10–15% В-лимфоцитов миндалина. Подобного рода результат, с нашей точки зрения, можно объяснить только малым количеством исследуемого белка. Интересно, что в этом FCRL1 не отличается от других членов семейства FCRL

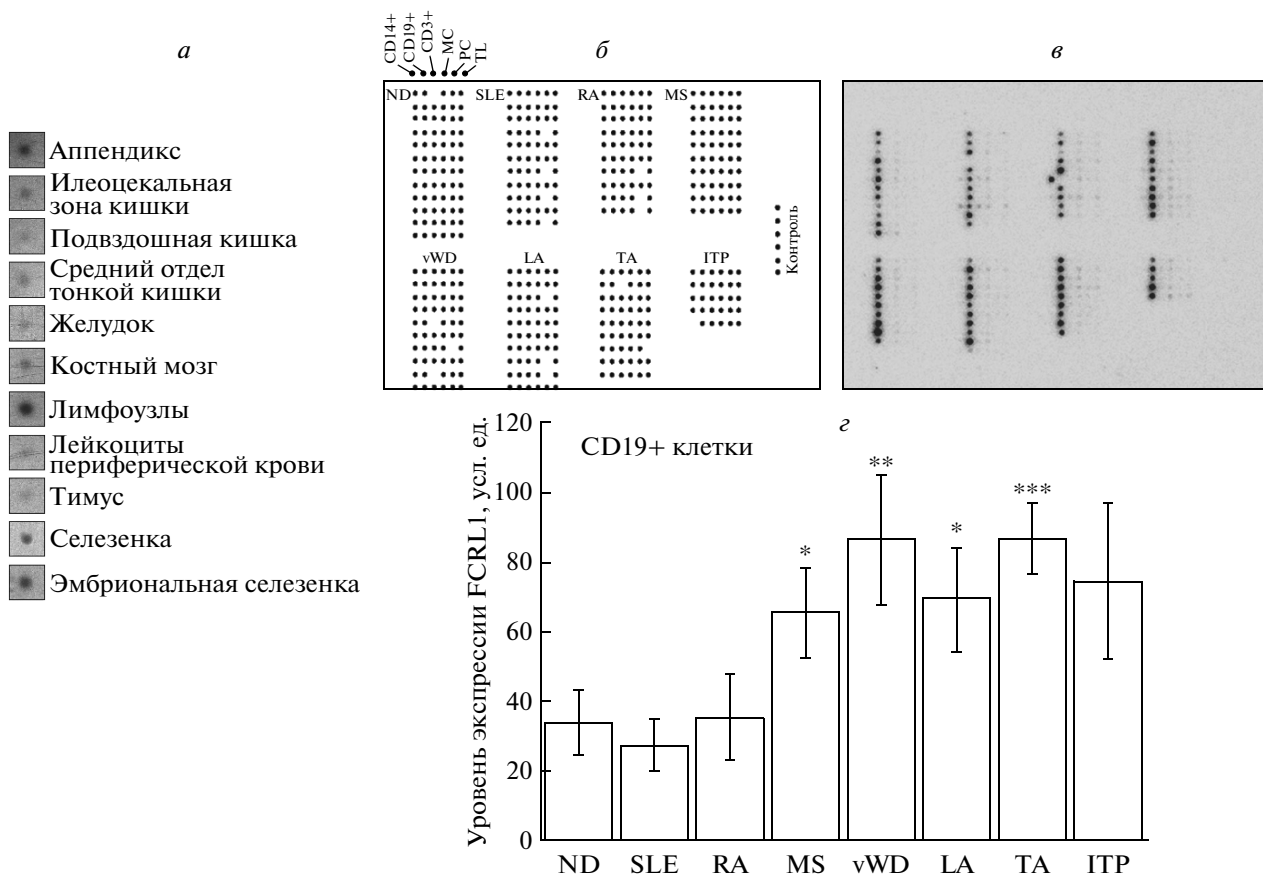


Рис. 2. Анализ экспрессии гена *FCRL1* в здоровых тканях человека и в субпопуляциях клеток крови больных с аутоиммунной патологией. Дот-гибридизация зонда *FCRL1* на мембране Multiple Tissue Expression Array с образцами кДНК, полученными из здоровых тканей человека (а). *FCRL1* экспрессируется преимущественно в тканях иммунной системы (селезенка, эмбриональная селезенка, лимфоузлы, костный мозг, лейкоциты периферической крови), а также в органах желудочно-кишечного тракта (желудок, средний отдел тонкой кишки, подвздошная кишка, илеоцекальная зона кишки, аппендикс). Схема расположения образцов кДНК из клеток крови больных аутоиммунными заболеваниями на мембране Autoimmune Disease Profiling Array (б). Образцы кДНК разных индивидов, полученные из шести популяций клеток крови (CD14+ моноциты, CD19+ В-лимфоциты, CD3+ Т-лимфоциты, MC – мононуклеарные клетки, PC – полиморфноядерные лейкоциты, TL – суммарные лейкоциты), нанесены в виде матрицы микроочек на мембрану, где строки соответствуют разным больным, а столбцы – субпопуляциям клеток крови. Дот-гибридизация зонда *FCRL1* на мембране Autoimmune Disease Profiling Array. Мембрана после гибридизации (в). Уровень экспрессии *FCRL1* (в условных единицах) в CD19+ В-клетках больных аутоиммунными заболеваниями (г). Результаты представлены в виде диаграммы, где величина столбика показывает среднее значение, линии ошибок – стандартное отклонение. Обозначения: ND – здоровый донор (N = 12), SLE – системная красная волчанка (N = 11), RA – ревматоидный артрит (N = 10), MS – рассеянный склероз (N = 10), vWD – болезнь Виллебранда (N = 10), LA – антифосфолипидный синдром (N = 10), TA – артериит Такаясу (N = 9), ITP – идиопатическая тромбоцитопения (N = 5); вероятность ошибки показана звездочками: *** – $p < 0.001$, ** – $p < 0.01$, * – $p < 0.05$.

(исключение составляет только FCRLA), экспрессирующихся на очень низком уровне [6].

Экспрессия гена *FCRL1* при аутоиммунных заболеваниях

Возможную связь между уровнем экспрессии гена *FCRL1* и аутоиммунными заболеваниями оценивали с использованием дот-блот-гибридизации на мембранах Autoimmune Disease Profiling Array, содержащих образцы кДНК, полученные из субпопуляций лейкоцитов периферической крови больных рассеянным склерозом, антифосфо-

липидным синдромом, идиопатической тромбоцитопенией, артериитом Такаясу, системной красной волчанкой и ревматоидным артритом (рис. 2б–г). Контролем в этой панели служили образцы кДНК из лейкоцитов здоровых доноров и индивидов с болезнью Виллебранда – заболевания, не относящегося к аутоиммунным. Гибридационный сигнал получен с кДНК В-клеток (CD19+), но не с кДНК моноцитов и макрофагов (CD14+), а также Т-клеток (CD3+). Слабые сигналы давала суммарная фракция мононуклеарных клеток крови и фракция полиморфноядерных лейкоцитов. Мы предполагаем, что в последнем

случае гибридизационные сигналы обусловлены контаминацией этой фракции В-лимфоцитами. Количественная оценка гибридизационных сигналов и последующая статистическая обработка с помощью непараметрического анализа Краскела–Уоллиса выявили статистически значимые отличия в экспрессии *FCRL1* между исследованными группами ($H = 7$, $N = 77$; $p = 0.001$). Парное сравнение данных для каждого из аутоиммунных заболеваний и контрольной группы, проведенное с использованием критерия Манна–Уитни, показало, что уровень экспрессии гена *FCRL1* в периферических CD19+ В-лимфоцитах значимо выше у больных рассеянным склерозом ($U = 29$; $p < 0.05$), антифосфолипидным синдромом ($U = 27$; $p < 0.05$), артериитом Такаясу ($U = 9$; $p < 0.001$) и болезнью Виллебранда ($U = 21$; $p < 0.01$) (рис. 2з), чем у здоровых индивидов. У больных идиопатической тромбоцитопенией наблюдалась тенденция ($U = 14$; $p < 0.1$) к значимому отличию от контрольной группы. При системной красной волчанке и ревматоидным артритом уровень экспрессии гена был близок к норме. Одной из причин возникновения многих аутоиммунных заболеваний считается нарушение иммунного гомеостаза организма, определяемого балансом регуляторных сигналов [29]. Известно, что рецептор *FCRL1* обладает активирующим сигнальным потенциалом [23], поэтому повышение экспрессии его гена в В-клетках при определенных аутоиммунных патологиях было ожидаемым. Однако, чтобы понять, играет ли *FCRL1* какую-либо специфическую роль в аутоиммунном процессе, необходимы дополнительные исследования. Неожиданным оказалось повышение экспрессии гена *FCRL1* в В-клетках при болезни Виллебранда. Это заболевание связано с нарушением свертывания крови и обусловлено, главным образом, генетическими дефектами белков, участвующих в формировании тромба. Среди множества форм этого заболевания выделяют и приобретенную форму, которая возникает чаще всего у больных с иммунологическими и лимфо-пролиферативными заболеваниями, сопровождаемыми образованием антител против фактора Виллебранда или избирательной адсорбцией его олигомеров клетками опухолей [30]. Однако о какой-либо связи болезни Виллебранда с изменением активности В-лимфоцитов до сих пор не сообщалось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, *FCRL1* обнаружен на небольшой (10–15%) субпопуляции зрелых наивных В-лимфоцитов человека, где в норме представлен на низком уровне. Экспрессия гена *FCRL1* статистически значимо повышена в В-лимфоцитах периферической крови при некоторых аутоиммунных заболеваниях и болезни Виллебранда. Получен-

ные нами *FCRL1*-специфичные антитела, способные выявлять этот белок с помощью проточной цитометрии, иммуноблоттинга и иммуногистохимически, будут полезны для изучения как функции этого рецептора, так и его роли в аутоиммунных патологиях.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-01074а), программ Российской академии наук “Фундаментальные науки – медицине” и “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. LeBien T.W., Tedder T.F. 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. **112**, 1570–1580.
2. Dalakas M.C. 2008. B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **4**, 557–567.
3. Blank M., Shoenfeld Y. 2007. B cell targeted therapy in autoimmunity. *J. Autoimmun.* **28**, 62–68.
4. Clark E.A., Lane P.J. 1991. Regulation of human B-cell activation and adhesion. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 97–127.
5. Batista F.D., Harwood N.E. 2009. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 15–27.
6. Davis R.S. 2007. Fc receptor-like molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 525–560.
7. Maltais L.J., Lovering R.C., Taranin A.V., Colonna M., Ravetch J.V., Dalla-Favera R., Burrows P.D., Cooper M.D., Davis R.S. 2006. New nomenclature for Fc receptor-like molecules. *Nat. Immunol.* **7**, 431–432.
8. Mechetina L.V., Najakshin A.M., Volkova O.Y., Guselnikov S.V., Faizulin R.Z., Alabyev B.Y., Chikhaev N.A., Vinogradova M.S., Taranin A.V. 2002. FCRL, a novel member of the leukocyte Fc receptor family possesses unique structural features. *Eur. J. Immunol.* **32**, 87–96.
9. Davis R.S., Li H., Chen C.C., Wang Y.H., Cooper M.D., Burrows P.D. 2002. Definition of an Fc receptor-related gene (FcRX) expressed in human and mouse B cells. *Int. Immunol.* **14**, 1075–1083.
10. Masir N., Jones M., Pozzobon M., Marafioti T., Volkova O.Y., Mechetina L.V., Hansmann M.L., Natkunam Y., Taranin A.V., Mason D.Y. 2004. Expression pattern of FCRL (FREB, FcRX) in normal and neoplastic human B cells. *Br. J. Haematol.* **127**, 335–343.
11. Facchetti F., Cella M., Festa S., Fremont D.H., Colonna M. 2002. An unusual Fc receptor-related protein expressed in human centroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 3776–3781.
12. Guselnikov S.V., Ershova S.A., Mechetina L.V., Najakshin A.M., Volkova O.Y., Alabyev B.Y., Taranin A.V. 2002. A family of highly diverse human and mouse genes structurally links leukocyte FcR, gp42 and PECAM-1. *Immunogenetics.* **54**, 87–95.
13. Davis R.S., Wang Y.H., Kubagawa H., Cooper M.D. 2001. Identification of a family of Fc receptor homologs with preferential B cell expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 9772–9777.

14. Hatzivassiliou G., Miller I., Takizawa J., Palanisamy N., Rao P.H., Iida S., Tagawa S., Taniwaki M., Russo J., Neri A., Cattoretti G., Clynes R., Mendelsohn C., Chaganti R.S., Dalla-Favera R. 2001. IRTA1 and IRTA2, novel immunoglobulin superfamily receptors expressed in B cells and involved in chromosome 1q21 abnormalities in B cell malignancy. *Immunity*. **14**, 277–289.
15. Miller I., Hatzivassiliou G., Cattoretti G., Mendelsohn C., Dalla-Favera R. 2002. IRTAs: a new family of immunoglobulinlike receptors differentially expressed in B cells. *Blood*. **99**, 2662–2669.
16. Davis R.S., Ehrhardt G.R., Leu C.M., Hirano M., Cooper M.D. 2005. An extended family of Fc receptor relatives. *Eur. J. Immunol.* **35**, 674–680.
17. Ершова С.А., Някшин А.М., Мечетина Л.В., Пекло М.М., Шевелев А.Я., Власик Т.Н., Чикаев Н.А., Таранин А.В. 2005. Сравнительный анализ экспрессии семейства генов *IFGP* у человека и мыши. *Молекуляр. биология*. **39**, 776–785.
18. Polson A.G., Zheng B., Elkins K., Chang W., Du C., Dowd P., Yen L., Tan C., Hongo J.A., Koeppen H., Ebens A. 2006. Expression pattern of the human FcRH/IRTA receptors in normal tissue and in B-chronic lymphocytic leukemia. *Int. Immunol.* **18**, 1363–1373.
19. Daëron M., Jaeger S., Du Pasquier L., Vivier E. 2008. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol. Rev.* **224**, 11–43.
20. Humphrey M.B., Lanier L.L., Nakamura M.C. 2005. Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunol. Rev.* **208**, 50–65.
21. Newman W.G., Zhang Q., Liu X., Walker E., Ternan H., Owen J., Johnson B., Greer W., Mosher D.P., Maksymowych W.P., Bykerk V.P., Keystone E.C., Amos C.I., Siminovitich K.A. 2006. Rheumatoid arthritis association with the FCRL3 -169C polymorphism is restricted to PTPN22 1858T-homozygous individuals in a Canadian population. *Arthritis Rheum.* **54**, 3820–3827.
22. Li F.J., Ding S., Pan J., Shakhmatov M.A., Kashentseva E., Wu J., Li Y., Soong S.J., Chiorazzi N., Davis R.S. 2008. FCRL2 expression predicts IGHV mutation status and clinical progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **112**, 179–187.
23. Leu C.M., Davis R.S., Gartland L.A., Fine W.D., Cooper M.D. 2005. FcRH1: an activation coreceptor on human B cells. *Blood*. **105**, 1121–1126.
24. Du X., Nagata S., Ise T., Stetler-Stevenson M., Pastan I. 2008. FCRL1 on chronic lymphocytic leukemia, hairy cell leukemia, and B-cell non-Hodgkin lymphoma as a target of immunotoxins. *Blood*. **111**, 338–343.
25. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press.
26. Volkova O.Y., Reshetnikova E.S., Mechetina L.V., Chikaev N.A., Najakshin A.M., Faizulin R.Z., Duzhak T.G., Taranin A.V. 2007. Generation and characterization of monoclonal antibodies specific for human FCRLA. *Hybridoma*. **26**, 78–85.
27. Baranov K., Volkova O., Chikaev N., Mechetina L., Laktionov P., Najakshin A., Taranin A. 2008. A direct antigen-binding assay for detection of antibodies against native epitopes using alkaline phosphatase-tagged proteins. *J. Immunol. Methods*. **332**, 73–81.
28. Perry M., Whyte A. 1998. Immunology of the tonsils. *Immunol. Today*. **19**, 414–421.
29. Ravetch J.V., Lanier L.L. 2000. Immune inhibitory receptors. *Science*. **290**, 84–89.
30. Tefferi A., Nichols W.L. 1997. Acquired von Willebrand disease: concise review of occurrence, diagnosis, pathogenesis, and treatment. *Am. J. Med.* **103**, 536–540.