

УДК 577.27

Механизмы функционирования белка PGLYRP1/Tag7 во врожденном и приобретенном иммунитете

Д. В. Яшин¹, Л. П. Сащенко, Г. П. Георгиев

Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: yashin_co@mail.ru

Поступила в редакцию 29.07.2020

Принята к печати 19.10.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11102

РЕФЕРАТ Одним из перспективных направлений современной молекулярной биологии является поиск новых белков, регулирующих различные этапы иммунного ответа, и изучение молекулярных механизмов действия этих белков. К таким белкам относится многофункциональный белок PGLYRP1/Tag7, принадлежащий к семейству PGRP-S, ген которого был открыт у мышей в 1996 г. в Институте биологии гена РАН. PGLYRP1/Tag7 классифицирован как белок врожденного иммунитета, но также может участвовать в регуляции иммунных механизмов приобретенного иммунитета. В данной работе рассмотрено участие PGLYRP1/Tag7 в индукции механизмов антибактериальной защиты, а также в формировании субпопуляций цитотоксических лимфоцитов, обеспечивающих гибель опухолевых клеток. Подчеркнуто, что различная функциональная активность Tag7 в иммунном ответе обуславливается его способностью взаимодействовать с различными белками, создавая стабильные белковые комплексы. В комплексе с Hsp70 Tag7 способен индуцировать гибель опухолевых клеток, несущих рецептор TNFR1. В комплексе с белком Mts1 (S100A4) Tag7 способен стимулировать движение цитотоксических лимфоцитов как врожденного, так и приобретенного иммунитета к очагу поражения. Участие Tag7 в регуляции иммунологических процессов позволяет рассматривать его в качестве перспективного агента для терапии опухолей. На основе этих свойств Tag7 созданы аутологичные вакцины, прошедшие первую и вторую фазы клинических испытаний на пациентах с терминальной стадией меланомы и рака почек. Выделенный с помощью ограниченного протеолиза С-концевой пептид Tag7 защищает хрящевую и костную ткань голеностопного сустава мышей при индуцированном аутоиммунном артрите и может оказаться перспективным лекарственным соединением, блокирующим развитие воспалительных процессов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА PGLYRP1/Tag7, цитотоксичность, антибактериальный эффект, противоопухолевая терапия, Mts1, Hsp70, HspBP1, TNFR1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Tag7 (tumor antagonistic gene) – белковый продукт гена антагониста опухолей 7; PGRP (peptide glycane recognizing protein) – белок, распознающий пептидогликан; ПАФ – полный адьювант Фрейнда; Mts1 – метастазин 1; Hsp70 – белок теплового шока 70 кДа.

ВВЕДЕНИЕ

Для понимания способов защиты организма от клеток с чужеродными или видоизмененными антигенами необходимо иметь представление о механизмах действия регуляторных и эффекторных лимфоцитов и об активации таких лимфоцитов. Понимание этих процессов важно для проведения противовоспалительной и противоопухолевой терапии. В связи с этим одним из направлений современной иммунологии является изучение белков, вовлеченных в работу врожденного и адаптивного иммунитета, позволяющее глубже понять основы иммунного ответа и причины сбоев при различных патологиях. Перспективным представляется поиск новых бел-

ков, регулирующих активность клеток, участвующих в иммунном ответе, и изучение молекулярных механизмов действия этих белков. Один из таких белков – белок PGLYRP1/Tag7.

Ген этого белка был открыт у мышей в 1996 г. в Институте биологии гена РАН в лаборатории одного из авторов (Георгия Павловича Георгиева) путем вычитания библиотек кДНК из метастазирующей и не метастазирующей линии опухолевых клеток мыши. Белок получил техническое название Tag7 [1]. Оказалось, что этот белок играет важную роль в противоопухолевой защите [2], поэтому его название можно расшифровать как белковый продукт гена антагониста опухолей (tumor antagonistic gene).

В 1998 г. Канг и соавт. [3] нашли в гемолимфе насекомых ген, структура которого была в высокой степени гомологична структуре гена *tag7*. Продукт этого гена был способен связываться с пептидогликанами клеточной стенки бактерий, он получил название PGRP (peptide glycane recognizing protein) [3]. Гомолог гена *PGRP* у мышей по структуре идентичен ранее описанному гену *tag7* [4, 5], т.е. Tag7 и PGRP – это один и тот же белок. Позднее, когда обнаружили семейство этих генов, термин PGRP был заменен на PGRP-S (small).

Дальнейшие функциональные исследования Tag7/PGRP-S пошли в двух направлениях. Исследователи в европейских лабораториях и в лабораториях США сосредоточились на изучении роли Tag7/PGRP-S во врожденном антибактериальном иммунитете. В ИБГ РАН в основном изучали механизмы противоопухолевого действия этого белка и связанные с этим проблемы.

СЕМЕЙСТВО БЕЛКОВ PGRP/Tag7

Белок Tag7/PGRP-S входит в состав небольшого белкового семейства. Члены этого семейства различаются длиной транскрипта: внеклеточный PGRP-S (короткая форма) [1, 3], длинный трансмембранный PGRP-L [5–7] и промежуточный PGRP-I [6]. Структурные исследования выявили на С-концевом участке аминокислотной последовательности всех белков этого семейства высококонсервативный участок из 160 аминокислотных остатков. Этот участок имеет три расположенных рядом PGR-домена, соединенных участками с консервативной аминокислотной последовательностью [6]. Только у PGRP-S перед PGR-доменом находится сигнальный пептид, свидетельствующий о способности PGRP-S секретироваться клеткой [5].

У человека обнаружены четыре белка семейства PGRP, обозначенные PGLYRP1, 2, 3 и 4. Первый соответствует Tag7/PGRP-S [8]. Он состоит из 196 аминокислот, имеет один сигнальный пептид и один PGR-домен. Ген этого белка экспрессируется в костном мозге, тимусе, эмбриональной печени, полиморфно-ядерных лимфоцитах, в лимфоидных клетках двенадцатиперстной кишки, селезенки, лимфоузлов, в альвеолярном эпителии и эндотелии легких [6, 9].

Анализ кристаллической структуры белков PGRP выявил лигандсвязывающий участок, узнающий специфическую последовательность пептидогликана. Также обнаружен участок белок-белкового узнавания, образованный специфической гидрофобной бороздкой и остатками консервативных аминокислот: Leu65, Arg18, Thr90, Glu93, Phe94, Leu133 [10].

Структура PGLYRP1/Tag7 обуславливает его функциональную активность. Связываясь с пептидогликаном, он может участвовать в активации антибактериальной защиты. Участки белок-белкового взаимодействия позволяют обеспечить взаимодействие PGLYRP1/Tag7 с другими белками с образованием стабильных комплексов, участвующих в индукции иммунного ответа. PGLYRP1/Tag7 обычно относят к белкам врожденного иммунитета, что не вполне соответствует действительности (см. ниже). Его участие в регуляции иммунной защиты исследуется достаточно широко. Можно выделить три основных направления в изучении функциональной активности PGLYRP1/Tag7: (1) участие PGLYRP1/Tag7 в антибактериальной защите, (2) роль Tag7 в активации лимфоцитов человека, (3) участие Tag7 в противоопухолевой терапии. В этой работе подробно рассмотрены эти направления, характеризующие PGLYRP1/Tag7 как активного регулятора иммунного ответа.

МЕХАНИЗМ УЧАСТИЯ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА PGRP ВО ВРОЖДЕННОМ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОМ ИММУНИТЕТЕ У НАСЕКОМЫХ

У насекомых белки PGRP могут индуцировать антибактериальный иммунный ответ через рецептор Toll или путь Imd [11–13].

После узнавания пептидогликана белки PGRP насекомых взаимодействуют с сериновой протеазой Grass, которая инициирует протеолитический каскад, заканчивающийся расщеплением белка Spatzle. Один из образующихся при этом фрагментов, Spatzle, образует гомодимер, вызывающий димеризацию и активацию Toll-рецептора, который далее индуцирует противомикробный ответ [14]. При активации Toll-независимого пути иммунного ответа белок PGRP-L взаимодействует с Imd. Последний индуцирует второй сигнальный путь, также приводящий к секреции антимикробных пептидов [11, 15–17].

МЕХАНИЗМ УЧАСТИЯ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА PGRP ВО ВРОЖДЕННОМ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОМ ИММУНИТЕТЕ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Все четыре белка PGRP человека и других млекопитающих являются растворимыми секретруемыми белками, обладающими как узнающей, так и эффекторной функциями [18, 19]. PGLYRP1, 3 и 4 способны непосредственно лизировать как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии [20–23]. PGLYRP3 является пептидогликан-амидогидролазой [24, 25].

Каждый из этих белков содержит один или два домена PGRP с сайтом связывания, специфичным

для мурамилпептидного фрагмента бактериального пептидогликана [18, 19]. Кроме того, PGRP способны взаимодействовать с липотейхоевой кислотой и липополисахаридом [22, 26]. Таким образом, PGRP взаимодействуют со всей наружной мембраной грамотрицательных бактерий [27].

Для лизиса бактерий PGRP использует три цитотоксических механизма. Во-первых, PGRP индуцирует окислительный стресс за счет повышенного образования пероксида водорода (H_2O_2) и гидроксильных радикалов ($HO\cdot$) [27, 28]. Во-вторых, PGRP вызывает тиоловый стресс, приводящий к истощению более 90% внутриклеточных тиолов. Третьим антибактериальным эффектом является металлический стресс, приводящий к увеличению концентрации внутриклеточных ионов Zn^{2+} и Cu^+ [27, 28]. Каждая стрессовая реакция в отдельности является только бактериостатической, и лишь комбинированная индукция всех трех стрессовых реакций является бактерицидной [27].

Собственный антибактериальный эффект PGRP усиливается при совместной работе с клетками врожденного иммунитета. Например, фагоцитирующие клетки при фагоцитозе бактерий накачивают в фаголизосомы не только кислородные радикалы, но и Cu^+ и Zn^{2+} для усиления антибактериального эффекта [29, 30]. В ответ на это бактерии повышают экспрессию экспортеров Cu^+ и Zn^{2+} [27]. Белки PGRP предотвращают эти изменения, способствуя лизису бактерий [28]. Показано также, что PGRP могут работать синергически с антимикробными пептидами [31]. И наконец, показано взаимодействие PGRP-S с рецептором врожденного иммунитета TREM1, включающим провоспалительный иммунный ответ. Это взаимодействие будет рассмотрено ниже. Синергическое взаимодействие с другими защитными механизмами хозяина еще больше усиливает антибактериальную эффективность PGRP и предотвращает развитие резистентности, делая PGRP важным компонентом врожденного антибактериального иммунитета.

PGLYRP1/Tag7 В КОМПЛЕКСЕ С Hsp70 УБИВАЕТ МНОГИЕ ТИПЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

В первых работах было показано, что кондиционная среда опухолевых клеток VMR-0, трансфицированных конструкцией, обеспечивающей продукцию Tag7, обладает цитотоксическим эффектом для клеток VMR-0. Антитела к Tag7 нейтрализовали этот эффект, что позволило сделать вывод о цитотоксичности Tag7 [2].

Однако другой группой исследователей показано, что PGRP-S, экспрессированный в клетках *Escherichia coli*, не обладает цитотоксической активностью [4].

Далее оказалось, что Tag7, полученный в дрожжевой системе, также не обладает токсическим действием. Он, однако, способен образовывать стабильный эквимольный комплекс с основным белком теплового шока Hsp70, который и обладает высокой цитотоксичностью [32]. Комплекс Tag7-Hsp70 при его концентрации 10^{-10} М способен индуцировать клеточную смерть в широком спектре опухолевых клеточных линий.

Для создания стабильного комплекса важно участие двух доменов Hsp70. Tag7 может соединяться с пептидсвязывающим доменом Hsp70 и даже с 14-членным пептидом этого домена, находящегося на поверхности опухолевых клеток и играющего существенную роль в активации NK-клеток [33]. Однако комплексы Tag7 с этими фрагментами Hsp70 обладали низкой цитотоксической активностью, и присутствие АТФ-связывающего домена Hsp70 приводило к образованию высокоактивного цитотоксического комплекса [32].

Также показано, что клеточная линия Cos-1, трансфицированная геном *tag7*, выделяет в кондиционную среду комплекс Tag7-Hsp70, убивающий опухолевые клетки. Секретия этого комплекса осуществляется при помощи аппарата Гольджи [32]. По-видимому, клетки VMR-0, трансфицированные геном *tag7*, также выделяют Tag7 в комплексе с Hsp70, и этим объясняется Tag7-зависимая цитотоксическая активность кондиционной среды этих клеток.

Внутриопухолевое введение комплекса Tag7-Hsp70 тормозило рост опухолей. Так, инъекции комплекса Tag7-Hsp70 мышам, которым подкожно ввели клетки агрессивной меланомы М3, подавляли рост опухолей и более чем в 2 раза увеличивали продолжительность жизни животных [34].

Показано также, что полученные на 6-е сут культивирования с цитокином IL-2 ЛАК-клетки после инкубации с опухолевыми клетками-мишенями выделяют в кондиционную среду цитотоксический комплекс Tag7-Hsp70. Ингибитор аппарата Гольджи блокировал выделение этого комплекса лимфоцитами [32].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА Tag7-Hsp70 С РЕЦЕПТОРОМ TNFR1 ИНДУЦИРУЕТ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЫ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ

Детальное исследование механизмов цитотоксического действия комплекса показало, что в гетерогенной культуре опухолевых клеток разные клетки погибают в разные промежутки времени, и в них индуцируются различные механизмы клеточной гибели. Через 3 ч инкубации с комплексом Tag7-Hsp70 клетки погибали по пути апоптоза, через 20 ч в них

активировались механизмы некроптоза с участием RIP1-киназы [35].

Оба цитолитических процесса индуцировались при взаимодействии Tag7–Hsp70 с одним и тем же клеточным рецептором – TNFR1, специфичным к цитокину TNF-α.

Известно, что TNFR1 принадлежит к семейству рецепторов смерти, он может индуцировать альтернативные цитотоксические процессы программируемой гибели клеток – зависимый от каспаз апоптоз или некроптоз, зависимый от RIP1-киназы [36, 37]. В опухолевых клетках, в которых тем или иным способом подавлена активность каспаз, индуцируются процессы некроптоза [38].

Tag7–Hsp70 связывается с TNFR1 на плазматической мембране опухолевых клеток и взаимодействует с его внеклеточным доменом (sTNFR1) в растворе и на аффинной колонке. Антитела к TNFR1 во всех случаях блокируют этот процесс. Комплекс Tag7–Hsp70 можно рассматривать как новый лиганд рецептора TNFR1, индуцирующий апоптотические и некроптотические процессы в опухолевых клетках [35].

При апоптотической гибели клеток цитотоксическое действие комплекса Tag7–Hsp70 обусловлено последовательной активацией каспазы 8 и каспазы 3. Механизмы внутриклеточного апоптоза с участием митохондрий и каспазы 9 не активировались [35].

Некроптоз начинается с образования некрсомы при участии киназ RIP1 и RIP3. Далее цитотоксический сигнал передается клеточным органеллам – лизосомам и митохондриям. При некроптотической гибели клеток ключевая роль отводится накоплению

активных форм кислорода на мембранах митохондрий. Установлена связь между активацией лизосом и митохондриями. Блокирование каталитической активности вышедших во внутриклеточное пространство лизосомных катепсинов тормозило изменение мембранного потенциала митохондрий и накопление активных форм кислорода [39] (рис. 1).

При этом Tag7 и Hsp70 играют разные роли в индукции цитотоксических процессов. Известно, что активация цитотоксического сигнала – двухстадийный процесс. На первой стадии цитотоксический лиганд связывается с внеклеточным доменом рецептора, на второй стадии изменяется структура внутриклеточного домена TNFR1 с образованием «домена смерти», активирующего внутриклеточные цитотоксические процессы [40].

Необходимым условием образования домена смерти является тримеризация рецептора TNFR1 [40]. Tag7 может связываться с TNFR1 в форме мономера без участия Hsp70, но он не способен вызывать образование тримеров рецептора на клеточной поверхности и, как следствие, индуцировать клеточную гибель. Конкурируя с цитотоксическими лигандами за участок связывания с TNFR1, Tag7 ингибирует цитотоксическое действие как TNF-α, так и комплекса Tag7–Hsp70. Hsp70 не может связываться с TNFR1, но его взаимодействие с Tag7 необходимо для индукции цитотоксичности [35].

С помощью ограниченного трипсинолиза выделен 12-членный пептид, расположенный на С-концевом участке Tag7. Этот пептид способен связываться с рецептором TNFR1 в растворе и на клеточной поверхности [41]. При синтезе этот пептид обозначен

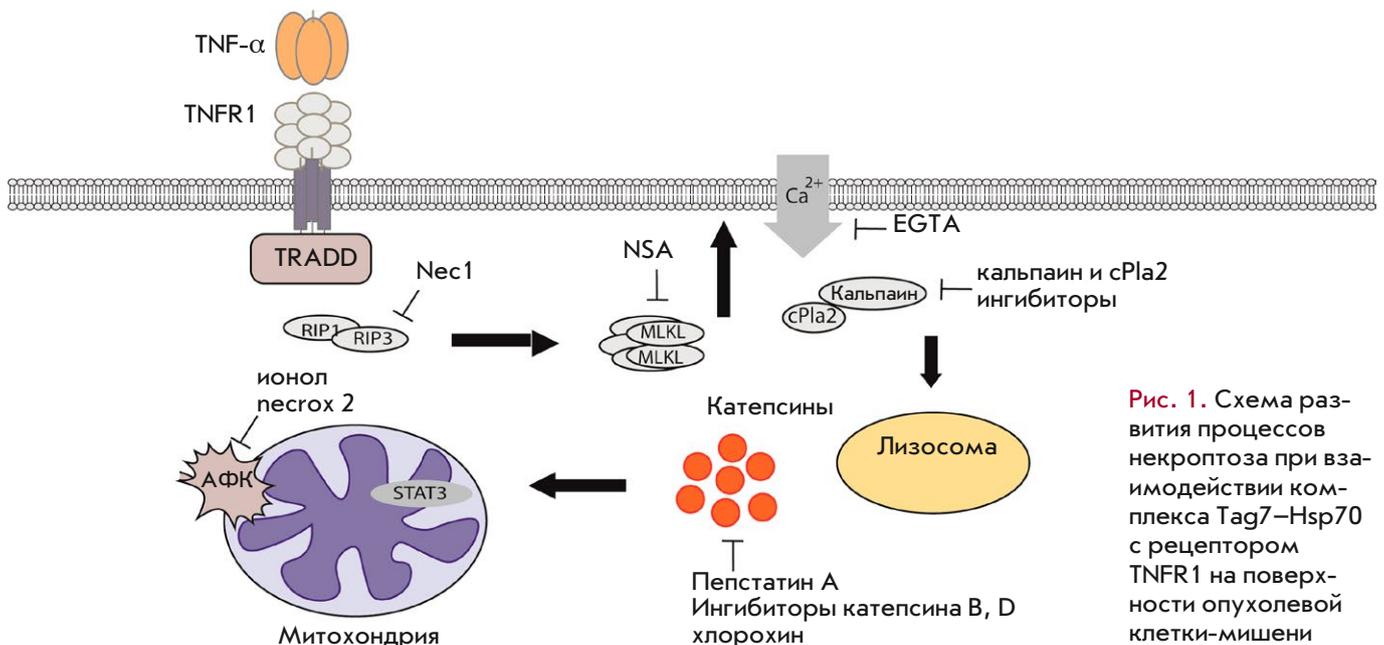


Рис. 1. Схема развития процессов некроптоза при взаимодействии комплекса Tag7–Hsp70 с рецептором TNFR1 на поверхности опухолевой клетки-мишени

как 17.1. Пептид 17.1, как и полноразмерный Tag7, не индуцировал гибель клеток, но ингибировал цитотоксическую активность и TNF- α , и комплекса Tag7–Hsp70 [41]. Интересно, что этот же пептид способен взаимодействовать с белком теплового шока Hsp70 и образовывать цитотоксический комплекс 17.1–Hsp70, индуцирующий смерть клеток [41].

Пептид 17.1 ингибировал функциональную активность TNF- α не только в клеточной, но и в мышинной модели. Противовоспалительное действие пептида 17.1 изучали на модели аутоиммунного артрита, индуцированного ПАФ (полный адъювант Фрейнда), который стимулирует выделение TNF- α в ткани. Установлено протективное действие этого пептида на хрящевую и костную ткань голеностопного сустава мышей [41]. Можно предположить, что пептид 17.1 окажется перспективным лекарственным соединением, способным блокировать развитие воспалительных процессов.

БЕЛОК МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ Mts1/S100A4 РАЗРУШАЕТ КОМПЛЕКС Tag7–Hsp70

Многие активно метастазирующие линии опухолевых клеток нечувствительны к действию комплекса Tag7–Hsp70. Один из важных белков, стимулирующих метастазирование, – метастазин 1 (Mts1/S100A4), принадлежит к семейству Ca²⁺-связывающих белков S100 [42, 43]. Оказалось, что Mts1 образует стабильные комплексы с Tag7 и Hsp70. Интересно, что Mts1 связывается с тем же участком белка Tag7, что и Hsp70. При взаимодействии Mts1 с комплексом Tag7–Hsp70 происходит диссоциация последнего с образованием комплексов Mts1–Tag7 и Mts1–Hsp70, которые не обладают цитотоксичностью [44]. Таким образом, секреция Mts1 опухолевыми клетками защищает их от токсического действия Tag7–Hsp70 [45].

Действительно, клетки с высоким уровнем Mts1 не являются мишенями для цитотоксического комплекса Tag7–Hsp70. Как правило, этот комплекс индуцирует цитотоксический сигнал в опухолевых клетках с низким метастатическим потенциалом [45]. Очевидно, это связано с секрецией активно метастазирующими клетками белка Mts1 в высокой концентрации, что приводит к диссоциации цитотоксического комплекса. В этом случае секреция Mts1 представляется одним из путей ускользания опухолевых клеток от действия цитотоксических агентов.

КОМПЛЕКС Tag7–Mts1 ЯВЛЯЕТСЯ ХЕМОКИНОМ

Противоречивые результаты получены при исследовании хемотактической активности Tag7: ученые одной группы утверждали, что Tag7 не способен вызывать хемотаксис лимфоцитов [4], другие обнаружили,

что Tag7, секретированный нейтрофилами, способен индуцировать движение клеток [2]. Как и в случае с цитотоксичностью Tag7, частично правыми были группы.

Сам, Tag7 не обладает хемотактической активностью, но комплекс Tag7–Mts1 вызывает направленное движение NK-клеток, а также CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов по градиенту концентрации этого комплекса [46]. Интересно, что для комплекса Tag7–Mts1 характерен ряд свойств, не присущих классическим хемокинам. Tag7–Mts1 – двухкомпонентный комплекс с высокой молекулярной массой, и ни один из входящих в его состав белков не обладает специфичной для большинства хемокинов структурой «греческий ключ». Тем не менее этот комплекс осуществляет индукцию хемотактического сигнала с помощью хемотактического рецептора CCR5, специфичного для лигандов, обладающих структурой классических хемокинов [47].

Белковые компоненты комплекса Tag7–Mts1, по-видимому, играют различные роли в индукции хемотаксиса. Показано, что Mts1 может связываться с внеклеточным доменом CCR5 и блокировать взаимодействие этого рецептора с лигандами. Однако такого связывания недостаточно для индукции клеточного движения. Tag7 не может взаимодействовать с рецептором CCR5, но, связываясь с Mts1, участвует в трансдукции хемотактического сигнала [47].

Комплекс Tag7–Mts1 может выделяться клетками иммунной системы, которые относятся как к врожденному, так и к приобретенному иммунитету [46]. Интересно, что секреция комплекса Tag7–Mts1 и соответственно индукция направленного движения лимфоцитов осуществляются без предварительной активации иммунокомпетентных клеток. Следовательно, эффекторные лимфоциты начинают движение по градиенту концентрации комплекса Tag7–Mts1 до начала иммунного ответа, что обеспечивает быстрое реагирование иммунной системы при попадании в организм патогенов.

Таким образом, Mts1, с одной стороны, разрушает цитотоксический комплекс Tag7–Hsp70, а с другой, образует комплекс Tag7–Mts1, привлекающий к опухоли разные типы Т-лимфоцитов, которые атакуют опухолевые клетки.

Tag7 и Mts1 УЧАСТВУЮТ В АКТИВНОСТИ CD4+ ЛИМФОЦИТОВ НОВОГО ТИПА, НАПРАВЛЕННЫХ ПРОТИВ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ЛИШЕННЫХ HLA

Tag7 и Mts1 взаимодействуют еще в одном процессе – в убийстве CD4⁺ лимфоцитами опухолевых клеток, лишенных комплекса HLA.

CD4⁺ Т лимфоциты – это в основном регуляторные иммунные клетки, которые участвуют в акти-

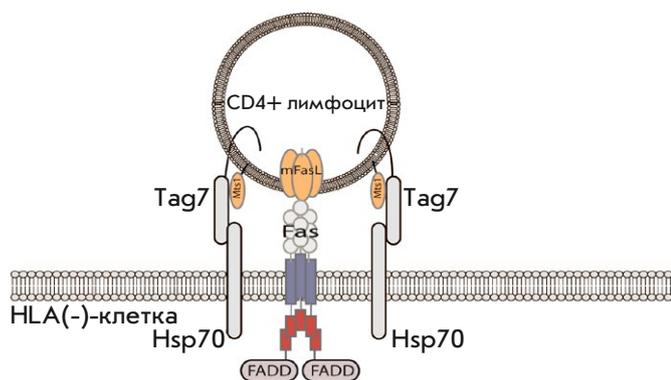


Рис. 2. Tag7 в комплексе с Mts1 участвует в распознавании CD4+ цитотоксическими лимфоцитами HLA-отрицательных опухолевых клеток

вазии эффекторных Т-клеток путем секреции широкого спектра цитокинов [48]. Кроме того, они могут убивать клетки, в том числе и опухолевые, несущие на поверхности белки главного комплекса гистосовместимости (МНС) типа II. Индукция клеточной смерти осуществляется по классическому пути за счет взаимодействия рецептора TCR с антигенами в комплексе с МНС II и секреции перфорина и гранзимов [48].

Однако недавно выявили еще не описанную субпопуляцию цитотоксических CD4+ Т-лимфоцитов, убивающих опухолевые клетки, на поверхности которых отсутствуют белки МНС I и МНС II, но представлен основной белок теплового шока Hsp70 [49].

Показано, что под действием IL-2 в ЛАК-клетках генерируются, в частности, цитотоксические CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты, которые убивают опухолевые клетки HLA⁻ при взаимодействии FasL на поверхности лимфоцита с рецептором Fas клеток-мишеней [50]. Tag7 присутствует на плазматической мембране обеих субпопуляций, но выполняет различные функции.

На цитоплазматической мембране цитотоксических CD4+ Т-лимфоцитов присутствуют не только Tag7 и FasL, но также и Mts1. Mts1 участвует в образовании межклеточного тройного комплекса между Tag7 и Mts1 лимфоцитов и Hsp70, представленным на мембране клеток-мишеней. Mts1 лимфоцитов наряду с Tag7 необходим для проявления цитотоксической активности этими лимфоцитами [44, 45].

Таким образом создается достаточно стабильный межклеточный комплекс Tag7–Mts1–Hsp70, позволяющий цитотоксическому лимфоциту закрепиться на поверхности клетки-мишени. В результате FasL лимфоцита взаимодействует с рецептором Fas клет-

ки-мишени и индуцирует клеточную смерть. И Tag7, и Mts1 абсолютно необходимы для проявления цитотоксичности [44] (рис. 2).

Ни TCR, ни гранзимы не участвуют в цитолизе этих клеток, индукция цитотоксического сигнала осуществляется за счет взаимодействия FasL лимфоцита с рецептором Fas клетки-мишени [49].

На поверхности этих CD4+ Т-лимфоцитов выявлен антиген CD127, что не характерно для регуляторных Т-клеток (Treg) [50].

Важно, что описанная субпопуляция Т-лимфоцитов, несущая на поверхности антигены CD3, CD4, CD25 и CD127 и белки Tag7, Mts1 и FasL, присутствует в крови нормальных доноров и составляет там около 1% Т-лимфоцитов. Возможно, ей принадлежит существенная роль в борьбе с опухолевыми клетками, «сбросившими» в ходе прогрессии комплекс HLA.

CD8+ Т-ЛИМФОЦИТЫ СЕКРЕТИРУЮТ ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС Tag7–Hsp70

Известно, что CD8+ Т-лимфоциты, активированные IL-2, способны убивать опухолевые клетки, сбросившие поверхностные антигены в комплексе с МНС II и вышедшие таким образом из-под классического иммунного контроля. Взаимодействие CD8+ Т-лимфоцитов с такими опухолевыми клетками осуществляется за счет связывания рецептора NKG2D лимфоцитов с неканонической молекулой МНС – MicA – на опухолевой клетке. Активированные IL-2 CD8+ Т-лимфоциты образуют межклеточный комплекс NKG2D–MicA [51]. Хотя на мембране этих лимфоцитов присутствует Tag7, а на мембране исследуемых опухолевых клеток экспрессированы и MicA, и Hsp70, комплекс Tag7–Hsp70 между CD8+ Т лимфоцитами и клетками-мишенями не образуется. Вероятно, это связано с отсутствием на мембране лимфоцита Mts1 (см. выше).

Взаимодействие NKG2D с MicA обеспечивает две функции цитотоксических лимфоцитов. Это, во-первых, индукция цитотоксического сигнала с последующей гибелью опухолевых клеток-мишеней благодаря связыванию FasL лимфоцита с рецептором Fas опухолевой клетки. Во-вторых, секреция в зону контакта клеток растворимого цитотоксического комплекса Tag7–Hsp70 [52]. Предполагается, что связывание рецептора Fas с FasL на поверхности лимфоцита индуцирует накопление комплекса Tag7–Hsp70 во внутриклеточных мембранах лимфоцитов. Для секреции этого комплекса необходимо дополнительное связывание MicA на поверхности клетки-мишени с NKG2D на поверхности лимфоцита, предположительно для создания межклеточной контактной зоны [52] (рис. 3).

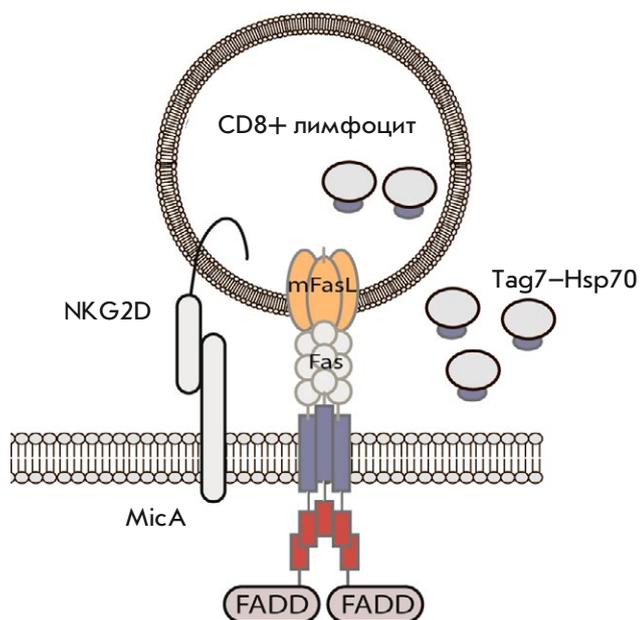


Рис. 3. Схема распознавания и убийства HLA-отрицательной опухолевой клетки CD8+ цитотоксическим лимфоцитом. Контакт с опухолевой клеткой-мишенью приводит к секреции цитотоксического комплекса Tag7-Hsp70

КОШАПЕРОН HspBP1 УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КОМПЛЕКСА Tag7-Hsp70

Установлено, что кошаперон HspBP1 – ингибитор АТФ-азной активности Hsp70, также может связываться с Tag7 и подавлять цитотоксическую активность комплекса Tag7-Hsp70 [53]. Возможны разные механизмы, приводящие к этому эффекту. Так HspBP1 может связываться с Tag7 и Hsp70 в тройной комплекс с последующей необратимой агрегацией и образованием крупных конгломератов, лишенных цитотоксической активности. Кроме того, HspBP1 может конкурентно вытеснять Hsp70 из комплекса Tag7-Hsp70. Образованный в результате такого замещения комплекс Tag7-HspBP1 не оказывал цитотоксического действия на опухолевые клетки. Этот комплекс довольно стабилен, он обнаружен в кондиционных средах некоторых опухолевых клеток и сыворотке человека [54]. В присутствии Hsp70 в высокой концентрации Tag7-HspBP1 диссоциирует с образованием цитотоксического комплекса Tag7-Hsp70 [53].

Интересно, что цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты секретируют Tag7-Hsp70 одновременно с его ингибитором HspBP1, в связи с чем цитотоксическая активность этого комплекса сохраняется не более 30 ч. Добавление антител к HspBP1 при хранении секретированного комплекса Tag7-Hsp70 предотвращало его инактивацию [53].

Таким образом, ингибитор присутствует в тех же лимфоцитах, которые содержат комплекс Tag7-Hsp70, и секретируется с использованием тех же механизмов. Для индукции его секреции также требуется образование контактной зоны между лимфоцитом и клеткой-мишенью [53].

PGLYRP1/Tag7 СВЯЗЫВАЕТСЯ С РЕЦЕПТОРОМ TREM1 И ИНДУЦИРУЕТ МЕХАНИЗМЫ ВРОЖДЕННОГО И ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА

Недавно было установлено, что Tag7 является лигандом рецептора врожденного иммунитета TREM1, который принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов и экспрессируется на моноцитах и нейтрофилах [55]. Предполагается, что TREM1 вовлечен в активацию моноцитов и провоспалительный иммунный ответ [56]. Взаимодействие Tag7 с TREM1 приводит к активации генов провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-6, IL-1 β) и секреции их продуктов [55, 57]. Скорее всего, это один из путей участия Tag7 в антибактериальной защите у млекопитающих, связанный с секрецией этих цитокинов.

Оказалось, однако, что активация лимфоцитов с последующей секрецией цитокинов, наблюдаемая при взаимодействии Tag7 с TREM1, не ограничивается стимулированием механизмов только антибактериальной защиты. Сигнал активации, индуцированный белком врожденного иммунитета Tag7, передается регуляторным и эффекторным лимфоцитам, принадлежащим к адаптивному иммунитету, и способствует формированию субпопуляций цитотоксических лимфоцитов, убивающих вышедшие из-под иммунного контроля опухолевые и инфицированные вирусом клетки [57]. Как и в случае лимфоцитов, активированных под действием IL-2, активированные Tag7 CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты узнавали на поверхности клеток-мишеней стрессовые белки (Hsp70 или неканонические молекулы HLA, MicA) и убивали эти клетки через взаимодействие FasL-Fas по пути апоптоза или некроптоза.

Показано также, что низкомолекулярный активатор иммунитета Тилорон способен вызывать появление точно таких же цитотоксических лимфоцитов, что указывает на общий механизм образования подобных цитотоксических популяций [58].

Tag7 И ТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Приведенные данные позволили предположить, что Tag7 является перспективным агентом для лечения онкологических заболеваний. На самом деле такие исследования были начаты раньше. Уже в первых работах по изучению функций белка Tag7 оценили его влияние на рост перевиваемых опухолей VMR-0 у мышей [59, 60]. Эти клетки, как и по-

давяющее большинство опухолей, не синтезируют Tag7. Клетки трансфицировали генетическими конструкциями, обеспечивающими умеренный синтез Tag7, так как более активный его синтез убивает клетки.

Контрольные опухоли VMR-0 росли быстро и убивали мышей примерно через месяц. Опухоли, синтезирующие Tag7, росли гораздо медленнее и по прошествии нескольких месяцев вообще исчезали. Далее мышам вводили смесь контрольных и трансфицированных клеток. Рост этих опухолей был промежуточным между ростом опухолей из контрольных и трансфицированных клеток, но по истечении нескольких месяцев опухоли опять-таки исчезали. Интересно, что опухоли, продуцирующие Tag7, подвергались сильной инфильтрации NK-клетками в отличие от контрольных опухолей.

Учитывая эти результаты, в Онкологическом центре им. Н.Н. Блохина (Москва) и в Онкологическом институте им. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург) проведена 1-я фаза клинических испытаний аутологичных вакцин на основе гена *tag7* [61, 62]. Испытания проводили на больных с меланомой или раком почек IV стадии, к которым уже были безуспешно применены все обязательные методы терапии. Из операционного материала получали культуры клеток. Их трансфицировали конструкцией с геном *tag7* человека, обеспечивающей синтез белка Tag7 клетками. Клетки после их инактивации рентгеновским облучением вводили подкожно тому же больному, от которого взята опухоль. Показана как полная безопасность применения вакцины, так и определенный положительный эффект в 20–25% случаев, который заключался в стабилизации роста опухоли или в ее частичном регрессе вплоть до полной редукции крупных метастазов.

В Онкологическом институте им. Н.Н. Петрова проведена и 2-я фаза клинических испытаний таких вакцин на 80 больных с теми же типами опухолей [63]. Число инъекций вакцин было увеличено (вплоть до 26). Часть больных не реагировала на терапию. С остальными контакт был утрачен через разные промежутки времени по причинам, не связанным с заболеванием. Учитывались только те больные, связь с которыми сохранялась до 5 лет. Из этих 74 пациентов 12 прожили более 5 лет: контакт с ними был утрачен через 5–15 лет, причем к моменту его потери у пациентов отсутствовали признаки прогрессии опухоли. Из *таблицы* видно, что судьбу некоторых пациентов удалось проследить вплоть до 15 лет. К сожалению, эти результаты не были формально засчитаны, поскольку испытания проводились по старым правилам, где доклинические исследования выполняла лаборатория-разработчик, а вакци-

ны готовили не в специальном сертифицированном учреждении, а в лаборатории или клинике.

Практическое излечение 16% безнадежных больных представляет определенный интерес, тем более что можно предполагать причины неудачи в других случаях. По-видимому, один из важнейших факторов в описанном методе терапии – привлечение к опухоли разных типов Т-лимфоцитов. С другой стороны, известен целый ряд механизмов, с помощью которых опухолевые клетки становятся неузнаваемыми для защитных Т-лимфоцитов [64]. Один из важных механизмов – это синтез опухолевыми клетками DP-L1, лиганда рецептора DP1 [64]. Показано, что антитела к DP-L1 или DP1 вызывают сильный терапевтический эффект у больных меланомой и рядом других опухолей за счет нарушения взаимодействия DP-L1–DP1 [64]. Известно уже несколько коммерческих лекарств этого типа. От совместного применения двух технологий можно ожидать сильный синергический эффект, так как каждая из них дополняет другую.

Важно также осуществить переход от аутологичных вакцин к аллогенным, что гораздо более технологично. Такой переход требует выполнения ряда генно-технологических операций. Работа в этом направлении ведется.

Таким образом, из 74 пациентов, судьба которых прослежена в течение 5 лет и более (время последнего контакта), 12 (16.2%) были живы и не имели признаков прогрессии опухоли при последнем контакте более чем через 5 лет, из них 9 через 7 лет и 3 – че-

Терапевтический эффект Tag7

Стадия опухоли	Последний контакт (лет после терапии)	Прогрессия опухоли	Исходный возраст
МЕЛАНОМА (63)			
3	15.4	Не было	33
3	15.2	То же	39
4	14.9	«-»	40
3	12.1	«-»	67
4	8.9	«-»	56
4	8.8	«-»	65
3	8.6	«-»	59
4	7.1	«-»	62
3	6.9	«-»	41
3	5.3	«-»	35
РАК ПОЧКИ (11)			
4	9.9	Не было. Умер через 10 лет по другой причине	58
4	5.2	Не было	65

рез 15 лет. Контакты были прерваны по причинам, не связанным с заболеванием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение следует подчеркнуть, что PGLYRP1/Tag7 занимает важное место среди белков-регуляторов, ключевых для развития иммунных реакций. PGLYRP1/Tag7 классифицирован как белок врожденного иммунитета, но может участвовать в регуляции иммунных механизмов как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Под действием Tag7 индуцируются механизмы антибактериальной защиты, а также формирование субпопуляций цитотоксических лимфоцитов, убивающих вышедшие из-под иммунного контроля клетки в противоопухолевом иммунитете. Под действием комплекса Tag7-Hsp70 умирают опухолевые клетки, несущие рецептор TNFR1.

Исследование кристаллической структуры Tag7 выявило существование в его молекуле сайта белок-белкового взаимодействия. Очевидно, что Tag7 может взаимодействовать с различными белками, и это взаимодействие обуславливает различную функциональную активность этого белка. В настоящее время способность белков изменять свою функцию после взаимодействия с другими белками и образования стабильных комплексов хорошо известна, как «совместительство» [65].

Вышеприведенные данные свидетельствуют о том, что Tag7 может связываться с пятью белками: TREM1, TNFR1, Hsp70, HspBP1, Mts1, причем два из них являются рецепторами, представленными на цитоплазматической мембране иммунных и опухолевых клеток и участвующими в индукции механизмов иммунного ответа. Взаимодействие Tag7 с этими белками приводит к развитию врожденных и адаптивных реакций, участвующих в защите организма от патогенов (рис. 4).

Антибактериальное действие Tag7 у насекомых связано с активацией каскада сериновых протеаз, которые переводят лиганд Toll-рецептора Spatzle в активную форму с последующим выделением антимикробных пептидов. У млекопитающих антибактериальная активность PGRP связана с тремя цитотоксическими механизмами: индукцией окислительного, тиолового и металлического стресса. При этом PGRP также функционирует в кооперации с другими механизмами иммунной защиты и антибактериальными пептидами.

Взаимодействие Tag7 с рецептором врожденного иммунитета TREM1 человека на ранней стадии активации моноцитов приводит к секреции провоспалительных цитокинов, индуцируя один из путей антибактериальной защиты. Дальнейшая передача

сигнала активации к регуляторным клеткам приводит к активации субпопуляций цитотоксических лимфоцитов, элиминирующих опухолевые и вирус-содержащие клетки, утратившие поверхностные антигены HLA.

Эти лимфоциты могут убивать опухолевые клетки, используя как контактный механизм лизиса за счет взаимодействия FasL-Fas, так и секреторный – за счет выделения в зону контакта цитотоксического комплекса Tag7-Hsp70.

Цитотоксическое действие комплекса Tag7-Hsp70 контролируется с помощью секреции кошаперона HspBP1. HspBP1 выделяется лимфоцитами одновременно с цитотоксическим комплексом и может ингибировать его активность за счет неупорядоченной агрегации тройного комплекса Tag7-Hsp70-HspBP1 или диссоциации комплекса Tag7-Hsp70.

Отдельно взятый Tag7, связываясь с внеклеточным доменом рецептора, блокирует трансдукцию цитотоксического сигнала в опухолевые клетки. Он не только не вызывает клеточную гибель, но и ингибирует цитотоксическое действие других лигандов TNFR1, главным образом активность TNF- α . Для индукции цитолиза под действием Tag7 необходим Hsp70 и образование цитотоксического комплекса на клеточной поверхности. В этой связи интересным представляется обнаружение пептидного фрагмента Tag7, модулирующего его функции. Расширение спектра таких функциональных пептидов может оказаться актуальным при разработке подходов к созданию лекарственных соединений, блокирующих развитие острых воспалительных процессов.

Участие Tag7 в иммунном ответе не ограничивается активацией цитотоксических лимфоцитов и проявлением цитотоксического действия на опухолевые клетки в комплексе с Hsp70. Показано, что Tag7 также может взаимодействовать с белком Mts1 (S100A4), обнаруженным у широкого спектра метастазирующих опухолей. Растворимый Mts1 конкурирует с Hsp70 за связывание с Tag7, вытесняя его из цитотоксического комплекса Tag7-Hsp70 с образованием неактивного комплекса Tag7-Mts1. Однако комплекс Tag7-Mts1 обладает хемотактической активностью и индуцирует направленное движение по градиенту концентрации этого комплекса эффекторных лимфоцитов и врожденного, и приобретенного иммунитета.

Комплекс Tag7-Mts1 секретируется клетками иммунной системы, главным образом нейтрофилами и моноцитами, без предварительной активации, что может обеспечивать быстрое развитие иммунных реакций после попадания в организм патогенов.

В опытах на мышах на ряде опухолевых линий показано, что инъекция опухолевых клеток, транс-

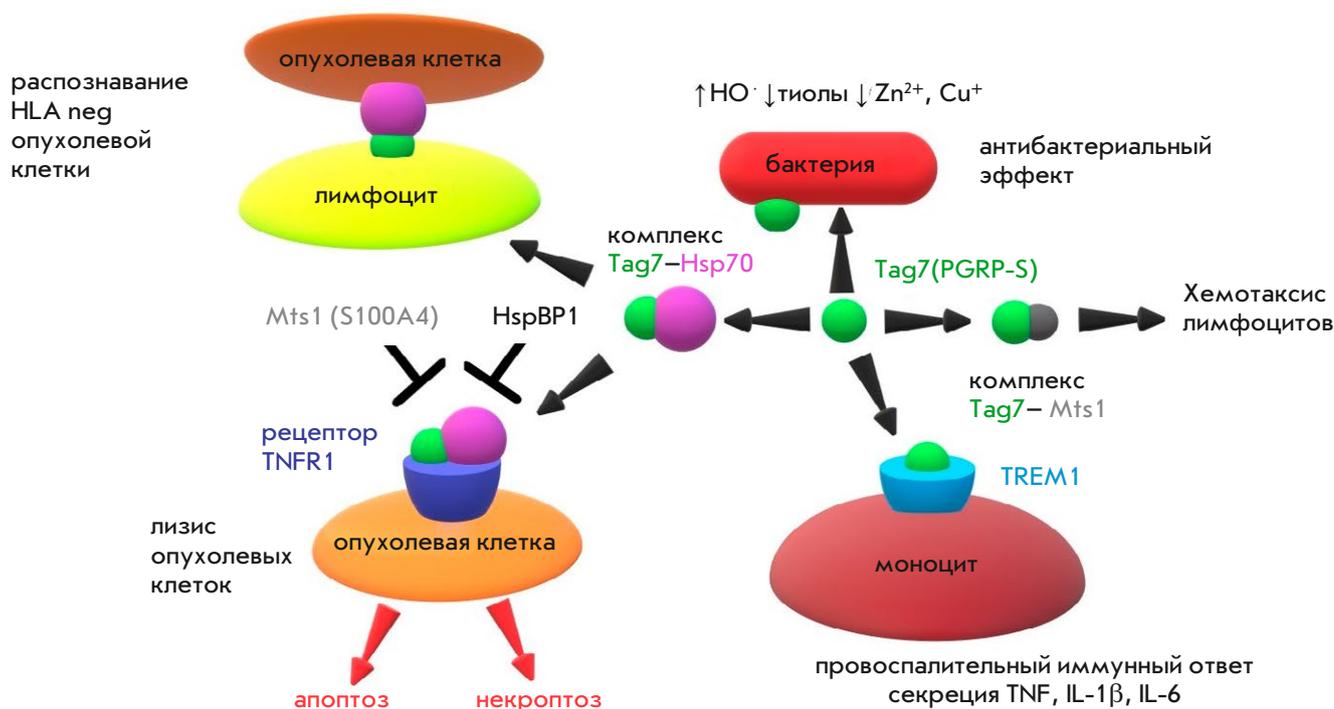


Рис. 4. Функции белка PGLYRP1/Tag7

фицированных конструкцией, продуцирующей Tag7, подавляет рост перевитой опухоли той же линии. На основе этих данных созданы аутологичные вакцины, прошедшие первую и вторую фазы клинических испытаний на безнадежных пациентах с меланомой и раком почек. В 12 из 74 случаев получено практическое излечение. Существует ряд воз-

можностей существенно увеличить эффективность терапии.

Суммируя вышесказанное, можно видеть, что Tag7 – многофункциональный белок, участвующий в регуляции различных этапов иммунного ответа и имеющий перспективы практического использования в онкологии. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kustikova O.S., Kiselev S.L., Borodulina O.R., Senin V.M., Afanas'eva A.V., Kabishev A.A. // *Genetika*. 1996. V. 32. № 5. P. 621–628.
- Kiselev S.L., Kustikova O.S., Korobko E.V., Prokhortchouk E.B., Kabishev A.A., Lukanidin E.M., Georgiev G.P. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 29. P. 18633–18639.
- Kang D., Liu G., Lundström A., Gelius E., Steiner H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. № 17. P. 10078–10082.
- Liu C., Gelius E., Liu G., Steiner H., Dziarski R. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 32. P. 24490–24499.
- Werner T., Liu G., Kang D., Ekengren S., Steiner H., Hultmark D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. № 25. P. 13772–13777.
- Liu C., Xu Z., Gupta D., Dziarski R. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 37. P. 34686–34694.
- Kibardin A.V., Mirkina I.I., Baranova E.V., Zakeyeva I.R., Georgiev G.P., Kiselev S.L. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 326. № 2. P. 467–474.
- Lu X., Wang M., Qi J., Wang H., Li X., Gupta D., Dziarski R. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 9. P. 5895–5907.
- Mirkina I.I., Kiselev S.L., Sashchenko L.P., Sadchikova E.R., Gnuchev N.V. // *Dokl. Akad. Nauk*. 1999. V. 367. № 4. P. 548–552.
- Kim M.S., Byun M., Oh B.H. // *Nat. Immunol.* 2003. V. 4. № 8. P. 787–793.
- Hultmark D. // *Curr. Opin. Immunol.* 2003. V. 15. № 1. P. 12–19.
- Söderhäll K., Cerenius L. // *Curr. Opin. Immunol.* 1998. V. 10. № 1. P. 23–28.
- Gottar M., Gobert V., Michel T., Belvin M., Duyk G., Hoffmann J.A., Ferrandon D., Royet J. // *Nature*. 2002. V. 416. № 6881. P. 640–644.
- Wang L., Weber A.N., Atilano M.L., Filipe S.R., Gay N.J., Ligoxygakis P. // *EMBO J.* 2006. V. 25. № 20. P. 5005–5014.
- Khush R.S., Leulier F., Lemaitre B. // *Trends Immunol.* 2001. V. 22. № 5. P. 260–264.
- Hoffmann J.A., Kafatos F.C., Janeway C.A., Ezekowitz R.A. // *Science*. 1999. V. 284. № 5418. P. 1313–1318.
- Takehana A., Katsuyama T., Yano T., Oshima Y., Takada H., Aigaki T., Kurata S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. № 21. P. 13705–13710.
- Dziarski R., Park S.Y., Kashyap D.R., Dowd S.E., Gupta D. // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 1. e0146162.
- Royet J., Dziarski R. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. V. 5. № 4. P. 264–277.
- Lu X., Wang M., Qi J., Wang H., Li X., Gupta D., Dziarski R. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 9. P. 5895–5907.

21. Tydell C.C., Yount N., Tran D., Yuan J., Selsted M.E. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 22. P. 19658–19664.
22. Tydell C.C., Yuan J., Tran P., Selsted M.E. // *J. Immunol.* 2006. V. 176. № 2. P. 1154–1162.
23. Li X., Wang S., Qi J., Echtenkamp S.F., Chatterjee R., Wang M., Boons G.J., Dziarski R., Gupta D. // *Immunity.* 2007. V. 27. № 3. P. 518–529.
24. Gelius E., Persson C., Karlsson J., Steiner H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 306. № 4. P. 988–994.
25. Wang Z.M., Li X., Cocklin R.R., Wang M., Wang M., Fukase K., Inamura S., Kusumoto S., Gupta D., Dziarski R. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 49. P. 49044–49052.
26. Sharma P., Dube D., Sinha M., Mishra B., Dey S., Mal G., Pathak K.M., Kaur P., Sharma S., Singh T.P. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 36. P. 31723–31730.
27. Kashyap D.R., Rompeca A., Gaballa A., Helmann J.D., Chan J., Chang C.J., Hozo I., Gupta D., Dziarski R. // *PLoS Pathog.* 2014. V. 10. № 7. e1004280.
28. Kashyap D.R., Kuzma M., Kowalczyk D.A., Gupta D., Dziarski R. // *Mol. Microbiol.* 2017. V. 105. № 5. P. 755–776.
29. Chandransu P., Rensing C., Helmann J.D. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2017. V. 15. № 6. P. 338–350.
30. German N., Doyscher D., Rensing C. // *Future Microbiol.* 2013. V. 8. № 10. P. 1257–1264.
31. Cho J.H., Fraser I.P., Fukase K., Kusumoto S., Fujimoto Y., Stahl G.L., Ezekowitz R.A. // *Blood.* 2005. V. 106. № 7. P. 2551–2558.
32. Sashchenko L.P., Dukhanina E.A., Yashin D.V., Shatalov Y.V., Romanova E.A., Korobko E.V., Demin A.V., Lukyanova T.I., Kabanova O.D., Khaidukov S.V., et al. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 3. P. 2117–2124.
33. Multhoff G., Pfister K., Gehrman M., Hantschel M., Gross C., Hafner M., Hiddemann W. // *Cell Stress Chaperones.* 2001. V. 6. № 4. P. 337–344.
34. Dukhanina E.A., Yashin D.V., Lukjanova T.I., Romanova E.A., Kabanova O.D., Shatalov Y.V., Sashchenko L.P., Gnuchev N.V. // *Dokl. Biol. Sci.* 2007. V. 414. P. 246–248.
35. Yashin D.V., Ivanova O.K., Soshnikova N.V., Sheludchenkova A.A., Romanova E.A., Dukhanina E.A., Tonevitsky A.G., Gnuchev N.V., Gabibov A.G., Georgiev G.P., Sashchenko L.P. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 35. P. 21724–21731.
36. Christofferson D.E., Yuan J. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010. V. 22. № 2. P. 263–268.
37. Holler N., Zaru R., Micheau O., Thome M., Attinger A., Valitutti S., Bodmer J.L., Schneider P., Seed B., Tschoep J. // *Nat. Immunol.* 2000. V. 1. № 6. P. 489–495.
38. Nagata S. // *Cell.* 1997. V. 88. № 3. P. 355–365.
39. Yashin D.V., Romanova E.A., Ivanova O.K., Sashchenko L.P. // *Biochimie.* 2016. V. 123. P. 32–36.
40. Wingfield P., Pain R.H., Craig S. // *FEBS Lett.* 1987. V. 211. № 2. P. 179–184.
41. Romanova E.A., Sharapova T.N., Telegin G.B., Minakov A.N., Chernov A.S., Ivanova O.K., Bychkov M.L., Sashchenko L.P., Yashin D.V. // *Cells.* 2020. V. 9. № 2. P. 488.
42. Ebralidze A., Tulchinsky E., Grigorian M., Afanasyeva A., Senin V., Revazova E., Lukanidin E. // *Genes Dev.* 1989. V. 3. № 7. P. 1086–1093.
43. Kriajevska M.V., Cardenas M.N., Grigorian M.S., Ambartsumian N.S., Georgiev G.P., Lukanidin E.M. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 31. P. 19679–19682.
44. Dukhanina E.A., Kabanova O.D., Lukyanova T.I., Shatalov Y.V., Yashin D.V., Romanova E.A., Gnuchev N.V., Galkin A.V., Georgiev G.P., Sashchenko L.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 33. P. 13963–13967.
45. Dukhanina E.A., Yashin D.V., Galkin A.V., Sashchenko L.P. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. № 4. P. 676–682.
46. Dukhanina E.A., Lukyanova T.I., Romanova E.A., Guerriero V., Gnuchev N.V., Georgiev G.P., Yashin D.V., Sashchenko L.P. // *Cell Cycle.* 2015. V. 14. № 22. P. 3635–3643.
47. Sharapova T.N., Romanova E.A., Sashchenko L.P., Yashin D.V. // *Acta Naturae.* 2018. V. 10. № 4. P. 115–120.
48. Appay V., Zaunders J.J., Papagno L., Sutton J., Jaramillo A., Waters A., Easterbrook P., Grey P., Smith D., McMichael A.J., et al. // *J. Immunol.* 2002. V. 168. № 11. P. 5954–5958.
49. Sashchenko L.P., Dukhanina E.A., Shatalov Y.V., Yashin D.V., Lukyanova T.I., Kabanova O.D., Romanova E.A., Khaidukov S.V., Galkin A.V., Gnuchev N.V., Georgiev G.P. // *Blood.* 2007. V. 110. № 6. P. 1997–2004.
50. Sharapova T.N., Romanova E.A., Sashchenko L.P., Yashin D.V. // *J. Immunol. Res.* 2018. V. 2018. P. 4501273.
51. Ivanova O.K., Sharapova T.N., Romanova E.A., Soshnikova N.V., Sashchenko L.P., Yashin D.V. // *J. Cell. Biochem.* 2017. V. 118. № 10. P. 3359–3366.
52. Sashchenko L.P., Romanova E.A., Ivanova O.K., Sharapova T.N., Yashin D.V. // *IUBMB Life.* 2017. V. 69. № 1. P. 30–36.
53. Yashin D.V., Dukhanina E.A., Kabanova O.D., Romanova E.A., Lukyanova T.I., Tonevitskii A.G., Raynes D.A., Gnuchev N.V., Guerriero V., Georgiev G.P., Sashchenko L.P. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 12. P. 10258–10264.
54. Yashin D.V., Dukhanina E.A., Kabanova O.D., Romanova E.A., Lukyanova T.I., Tonevitskii A.G., Belogurov A.A., Raynes D.A., Sheludchenkova A.A., Gnuchev N.V., et al. // *Biochimie.* 2012. V. 94. № 1. P. 203–206.
55. Read C.B., Kuijper J.L., Hjorth S.A., Heipel M.D., Tang X., Fleetwood A.J., Dantzer J.L., Grel S.N., Kastrup J., Wang C., et al. // *J. Immunol.* 2015. V. 194. № 4. P. 1417–1421.
56. Gibot S., Kolopp-Sarda M.N., Bénédicte M.C., Bollaert P.E., Lozniewski A., Mory F., Levy B., Faure G.C. // *J. Exp. Med.* 2004. V. 200. № 11. P. 1419–1426.
57. Sharapova T.N., Ivanova O.K., Soshnikova N.V., Romanova E.A., Sashchenko L.P., Yashin D.V. // *J. Innate Immun.* 2017. V. 9. № 6. P. 598–608.
58. Sharapova T.N., Romanova E.A., Sashchenko L.P., Yashin D.V. // *IUBMB Life.* 2019. V. 71. № 3. P. 376–384.
59. Larin S.S., Korobko E.V., Kustikova O.S., Borodulina O.R., Raikhlin N.T., Brisgalov I.P., Georgiev G.P., Kiselev S.L. // *J. Gene Med.* 2004. V. 6. № 7. P. 798–808.
60. Kiselev S.L., Larin S.S., Gnuchev N.V., Georgiev G.P. // *Genetika.* 2000. V. 36. № 11. P. 1431–1435.
61. Moiseenko V.M., Danilov A.O., Baldueva I.A., Danilova A.B., Tiukavina N.V., Larin S.S., Kiselev S.L., Orlova R.V., Semenova A.I., Turkevich E.A., et al. // *Vopr. Onkol.* 2004. V. 50. № 3. P. 293–303.
62. Moiseenko V.M., Danilov A.O., Baldueva I.A., Danilova A.B., Tyukavina N.V., Larin S.S., Kiselev S.L., Orlova R.V., Anisimov V.V., Semenova A.I., et al. // *Ann. Oncol.* 2005. V. 16. № 1. P. 162–168.
63. Novik A.V., Danilova A.B., Sluzhev M.I., Nehaeva T.L., Larin S.S., Girdyuk D.V., Protsenko S.A., Semenova A.I., Danilov A.O., Moiseenko V.M., et al. // *Oncologist.* 2020. doi: 10.1634/theoncologist.2020-0160. Online ahead of print.
64. Ingram J.R., Blomberg O.S., Rashidian M., Ali L., Garforth S., Fedorov E., Fedorov A.A., Bonanno J.B., Gall C.L., Crowley S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 15. P. 3912–3917.
65. Jeffery C.J. // *Protein Sci.* 2019. V. 28. № 7. P. 1233–1238.