

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Петрозаводский государственный университет»

На правах рукописи

Илюха Владимир Викторович

УЧАСТИЕ ПРОДУКТОВ ГЕНОВ *CFLAR* И *TMEM173* В ПРОГРАММИРОВАННОЙ
КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ У МЫШЕЙ ЛИНИЙ C57BL/6 И MSM,
РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ЕЁ АКТИВАТОРАМ

03.01.04 – Биохимия

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук
Полторак Александр Николаевич

Петрозаводск, 2019

Содержание

Содержание.....	1
ВВЕДЕНИЕ.....	3
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Клеточная смерть и ее биологическая роль	10
1.2 Клеточная смерть, инициируемая стрессом в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме	15
1.3 Сенсор двухцепочечной ДНК и циклических динуклеотидов - STING	17
1.4 Функции STING, не связанные с детекцией нуклеиновых кислот.....	19
1.5 Активация STING-опосредованного сигнального пути	20
1.6 Активация Т-клеток.....	22
1.7 Т-клетки и Toll-подобные рецепторы (TLR)	24
1.8 Т-клетки и интерферон первого типа (IFN типа I).....	27
1.9 Стресс эндоплазматического ретикулума и реакция на несвернутые белки клетки ..	31
1.10 Белок cFLIP	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1 Экспериментальные животные	37
2.2 Выделение клеток из различных тканей и органов, их подсчет и активация	38
2.3 Микроскопические методы	39
2.4 Выделение РНК и обратная транскрипция	40
2.5 Секвенирование транскрипта	40
2.6 Полимеразная цепная реакция	41
2.7 Качественный и количественный анализ белков и пептидов	42
2.8 Определение активности аланинаминотрансферазы	42
2.9 Трансфекция.....	42
2.10 Статистическая обработка результатов исследования	43
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	44
3.1 Влияние активации CD95 на мышей линий C57BL/6 и MSM различными агонистами	44
3.2 Влияние полиморфизма локуса <i>cFlar</i> на кодируемый им белок	54
3.3 Влияние полиморфизма <i>cFlar</i> на CASP8 и RIP1	58
3.4 Влияние STING на синтез интерферонов	63
3.5 Влияние DMXAA на сигналинг в Т-клетках	66
3.6 Влияние STING на элиминацию клеток.....	77

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	83
4.1 Влияние агонистов Fas/CD95 на клетки, ткани и органы мышечных линий MSM и C57BL/6	83
4.2 Вклад локуса <i>cFlar</i> в устойчивость клеток к программируемой смерти	85
4.3 Влияние STING на синтез интерферонов	88
4.4 Влияние DMXAA на сигнальные пути в Т-клетках.....	89
4.5 Взаимосвязь клеточной смерти с активацией STING в Т-клетках	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	94
ВЫВОДЫ.....	97
Список сокращений	99
Список литературы	104

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В настоящее время известно, что программируемая клеточная смерть имеет решающее значение для поддержания гомеостаза организма, а сбои, возникающие при реализации ее механизмов, часто приводят к самым серьезным последствиям (Манских, 2007). В живом организме ежедневно в силу различных причин (среди которых освобождение от выполнивших свою задачу, измененных и поврежденных клеток, процессы регенерации организма, механические повреждения и другие) элиминируется большое количество клеток (Thomas, Franklin-Tong, 2004). Особую роль программируемая клеточная смерть играет в реализации функций иммунной системы, в частности, в процессах селекции Т-клеток. (В ходе) позитивной селекции элиминируются клетки, не способные взаимодействовать с молекулами МНС (главный комплекс гистосовместимости от англ. major histocompatibility complex), а значит, не способные выполнять свои функции. (В результате) негативной селекции отсеиваются активно взаимодействующие с собственными антигенами клетки. В обоих случаях уничтожение клеток идет путем апоптоза. При нарушении данного пути появляются Т-клетки, способные самоактивироваться, что является причиной развития аутоиммунных заболеваний (Chen, Lai 2009). Актуальная проблема злокачественного перерождения клетки также тесно связана с нарушением процессов программируемой клеточной смерти (Ярилин, 2003).

Кроме того, клеточная смерть является важной составляющей системного иммунного ответа на инфекцию. Например, макрофаги и дендритные клетки, встречающие патоген первыми среди клеток иммунной системы, могут запускать воспалительный ответ. Его целью является активация других клеток иммунной системы, в частности, нейтрофилов, специализирующихся в фагоцитозе, для борьбы с патогеном. Альтернативным вариантом развития событий, хотя и негативным для клетки, но очень важным для организма на системном уровне, является запрограммированная клеточная смерть. Это сочетание очевидно при понимании функций клеточной смерти, так как препятствует размножению и распространению патогена по всему организму. В то же

время, возможность ликвидации патогена является весьма важным приобретением для организма, как сложной, многоуровневой системы (Murphy, Weaver, 2016).

Изучению биохимических механизмов реализации клеточной смерти посвящено большое количество работ (Dhanasekaran, Reddy, 2017; Jorgensen, Rayamajhi, Miao, 2017; Shi, Gao, Shao, 2017; Fuchs, Steller, 2015; Tower, 2015; Van Haute gem et al., 2015). Тем не менее, остаются актуальными ряд вопросов, связанных с этим значимым клеточным процессом, в частности, влияние мутаций в про- и антиапоптотических генах на его течение, различия в активационных механизмах *in vivo* в зависимости от микро- и макроокружения и ряд других. В последние годы сформировалось новое направление в изучении проблемы клеточной смерти, посвященное исследованию роли молекулярных сенсоров цитозольной ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) вирусного и бактериального происхождения, в том числе, IFI16-STING-cGAS (IFI16 – гамма-интерферон-индуцибельный протеин 16 от англ. gamma-interferon-inducible protein, STING – стимулятор интерфероновых генов от англ. Stimulator of interferon genes, cGAS - цикло-АМФ-ГМФ синтаза от англ. cyclic GMP-AMP synthase), в данном процессе (Almine et al., 2017). Считается, что они могут выполнять функцию ключевых биохимических молекул, участвующих на самых ранних этапах индукции клеточной смерти. Белковые продукты генов *Tmem173* (трансмембранный протеин 173 от англ. transmembrane protein 173 -, белок STING) и *cFlar* (каспаза 8 и FADD подобный регулятор апоптоза от англ. Caspase 8 And FADD Like Apoptosis Regulator – белок cFLIP) активно вовлекаются в процессы, связанные с программируемой клеточной смертью, а полиморфные формы указанных генов, представленные, в частности, у мышей линий C57BL/6 и MSM, могут оказывать большое влияние на их течение (Larkin B. et al., 2017, Ram D. R. et al., 2016). Подобные исследования являются актуальными, поскольку полученные результаты вносят определенный вклад в направление разработки таргетных лекарственных препаратов для иммунотерапии.

В целом, суммируя вышеизложенное, можно утверждать необходимость дальнейшего изучения критических клеточных процессов, таких как клеточная смерть, и связанных с ними сигнальных путей, поскольку даже незначительные изменения функционирования их отдельных компонентов способны весомо повлиять на итоговый результат. Сами же процессы являются основополагающими в развитии и выживании организма как комплексной системы. Например, полиморфизмы генов *cFlar* и *Tmem173*

определяют выживаемость клеток в различных условиях, что дает возможность глубже понять биохимические механизмы ключевых клеточных процессов, вовлеченных как в успешное выживание организма, так и во многие патологические процессы.

Цель и задачи исследования.

Целью настоящей работы являлось сравнительное изучение влияния продуктов генов *cFlar* и *Tmem173* на запрограммированную клеточную гибель у мышей линий C57BL/6 и MSM, различающихся по устойчивости к смерти, индуцированной агонистами Fas/CD95.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1) Идентифицировать локусы гена *cFlar*, вызывающие устойчивость мышей линии MSM к запрограммированной клеточной смерти, опосредованной через рецептор Fas/CD95.

2) Провести сравнительный анализ экспрессии гена *cFlar* и охарактеризовать биологическую роль белка cFLIP в клетках печени мышей линий MSM и C57BL/6.

3) Исследовать влияние полиморфизмов гена *cFlar* на экспрессию сплайс-изоформ cFLIP_L и cFLIP_R в гепатоцитах мышей линии MSM; изучить вклад данных белковых продуктов в устойчивость к Fas/CD95-индуцированной смерти.

4) Изучить сигнальные пути, активируемые в ответ на стимуляцию *Tmem173*/STING, в Т-клетках мышей линии C57BL/6; охарактеризовать механизм запрограммированной клеточной гибели с участием STING.

Научная новизна. Впервые в области пятого экзона гена *cFlar* идентифицирована инсерция в 21 п.н. (пар нуклеотидов), влияющая на альтернативный сплайсинг мРНК cFLIP (CASP8 и FADD-подобный регулятор апоптоза от англ. CASP8 and FADD-like apoptosis regulator). Данная область является 3'-UTR (3'-нетранслируемая область, от англ. 3'-untranslated region) для cFLIP_R и интронной областью для cFLIP_L, обуславливает высокое содержание сплайс-изоформы cFLIP_L в печени мышей, устойчивых к Fas/CD95-зависимой (- кластер дифференцировки от англ. cluster of differentiation) смерти (линия MSM), за счет преимущественного образования мРНК cFLIP_L в следствие альтернативного сплайсинга.

Впервые обнаружено, что по аналогии с клетками врожденного иммунитета в Т-клетках STING-опосредованный сигнальный путь индуцирует ответ IFN (интерферон от англ. Interferon) типа I, что является доказательством функционирования PRR (патоген распознающие рецепторы от англ. Pathogen recognition receptors) в Т-клетках, однако активация ТКР (Т-клеточный рецептор) приводит к ответу, не являющемуся взаимозависимым от STING агонистов.

Впервые продемонстрирована ранее не описанная для Т-клеток STING-зависимая индукция реакции на белки не прошедшие фолдинг (UPR – ответ на белки не прошедшие фолдинг от англ. unfolded protein response) с последующей программированной гибелью Т-клеток.

Научно-практическая значимость работы. Полученные данные о влиянии белковых продуктов генов *cFlar* и *Tmem173* на программируемую клеточную смерть расширяют существующие представления о механизмах и стратегиях адаптации организмов к различным условиям существования, а также позволяют глубже понять механизмы регуляции процессов программируемой клеточной смерти. Активация Т-клеток агонистами STING раскрывает их потенциал как перспективных иммунотерапевтических и/или противовирусных агентов, использование которых возможно в медицине. Важно также их использование как адъювантов вакцин с целью индукции интерферонового ответа.

Материалы диссертации могут быть использованы в лекционных курсах по биохимии и иммунологии для студентов биологических и медицинских специальностей вузов и колледжей, для написания учебных пособий, а также монографической литературы.

Положения, выносимые на защиту.

1. Устойчивость мышей линии MSM к активации программируемой клеточной смерти, опосредованной через рецептор Fas/CD95, обусловлена соотношением сплайс-изоформ $cFLIP_L$ и $cFLIP_R$ в печени: относительное количество изоформы $cFLIP_L$ в данном органе выше, чем изоформы $cFLIP_R$.

2. Высокое содержание изоформы $cFLIP_L$ в печени мышей линии MSM обусловлено инсерцией в 21 п.н. в 3'-UTR области пятого экзона гена *cFlar*,

способствующей преимущественному образованию в результате альтернативного сплайсинга cFLIP_L мРНК.

3. Изоформа cFLIP_L в гепатоцитах мышей линии MSM связывает каспазу 8 и предотвращает ее расщепление до p10/18, необходимое для запуска Fas/CD95-индуцированной клеточной смерти.

4. Стимуляция Т-клеток синтетическим STING-агонистом DMXAA приводит к индукции экспрессии интерферон-стимулирующих генов (ISGs), синтезу интерферонов I и II типа (IFN-β, IFN-γ, соответственно) и активации программируемой клеточной смерти (апоптоза).

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на региональных, всероссийских и международных конференциях: 15th International Congress of Immunology (Милан, 2013) Immunology&Cancer 2014 (Нижний Новгород, 2014); Science of the Future (Санкт-Петербург, 2014); 3rd Annual Meeting of the International-Cytokine-and-Interferon-Society (Bamberg, Germany, 2015); Высокопроизводительное секвенирование в геномике (Новосибирск, 2017); 15-ой и 16-ой Международных молодежных научно-практических конференциях «Фундаментальные исследования, методы и алгоритмы прикладной математики в технике, медицине и экономике» (Новочеркасск, 2017); 5th Annual Meeting of the International-Cytokine-and-Interferon-Society (Kanazawa, Japan, 2017) .

Диссертационная работа апробирована на заседании Ученого совета Института биологии, экологии и агротехнологий ПетрГУ, а также на научном семинаре Лаборатории молекулярной генетики врожденного иммунитета Института высоких биомедицинских технологий ПетрГУ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ, из которых 7 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК и 3 тезисов докладов.

Достоверность полученных результатов подтверждается наличием репрезентативной выборки объектов, адекватной целям и задачам исследования, проведенного с помощью современных методов, большим объемом фактического материала, который обработан с использованием традиционных методов статистики, применяемых в биологических исследованиях, публикацией результатов работы в

рецензируемых журналах и представлением докладов на региональных, всероссийских, и международных конференциях.

Личный вклад автора. Личный вклад автора в работу включает участие в разработке идей, последовательное планирование и постановку комплексных экспериментов, обработку и анализ полученных данных, участие в написании научных статей. В разных совместных публикациях вклад автора составил от 20 до 95%.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста, содержит 53 рисунка. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 6 разделов результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 249 наименований, из них 242 работы на иностранных языках.

Конкурсная поддержка и благодарности. Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики врожденного иммунитета Института высоких биомедицинских технологий ПетрГУ на средства гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего образования, научных учреждениях, подведомственных Федеральному агентству научных организаций, и государственных научных центров Российской Федерации (Постановление № 220, Договор №11.G34.31.0052 «Исследование рака. Апоптоз (программная смерть). Врожденный иммунитет. Воспаление, ожирение и его контроль»), гранта Российского научного фонда № 15-15-00100 («Новые пути активации врожденного иммунного ответа на инфекционную ДНК») и государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 6.5111.2017/8.9 («Изучение иммунного ответа на цитозольную ДНК»).

Автор выражает глубокую признательность своему учителю и наставнику – научному руководителю, заведующему лабораторией молекулярной генетики врожденного иммунитета, к.х.н. Александру Николаевичу Полтораку за всестороннюю поддержку в проведении исследования, а также всем сотрудникам лаборатории за ценные научные советы и особенно д.б.н., профессору Татьяне Олеговне Волковой за

большую помощь в освоении современных подходов и методов молекулярно-генетических исследований.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Клеточная смерть и ее биологическая роль

На сегодняшний день известно несколько типов клеточной смерти. Наиболее изученными являются апоптоз, некроптоз и пироптоз.

Апоптоз представляет собой форму запрограммированной клеточной гибели, которая опосредуется действием каспаз. В результате клетка распадается на апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной. Эти фрагменты поглощаются макрофагами либо соседними клетками без развития воспалительной реакции (Сербин, Щербак 2004). Ежедневно по пути апоптоза в организме взрослого человека уничтожаются сотни миллиардов клеток (Chen, Lai 2009). Инициация апоптоза может быть опосредована через трансмембранные клеточные рецепторы смерти, активируемые соответствующими лигандами, находящимися снаружи клетки, и в этом случае идет речь о внешнем пути активации апоптоза. В отсутствие внешних инициаторов апоптоза, клетка способна инициировать апоптоз в ходе митохондриального стресса, поэтому этот вид апоптоза называется внутренним (Барышников, Шишкин 2002). В обоих случаях в активации апоптоза участвует набор каспаз, разделяемых на 2 группы: инициаторные (2, 8, 9, 10, 12) и эффекторные (3, 6, 7) (Гордеева, Лабас, Звягильская, 2004; Cohen, 1997).

Многие патогены способны ингибировать апоптоза, что позволяет продлить жизнь инфицированной клетки и дает патогену время для его пролиферации. Например, одним из распространенных способов блокировки апоптоза является ингибирование регуляторной каспазы 8. Однако, чтобы препятствовать стратегии патогена, в результате эволюционных изменений появился альтернативный способ клеточной смерти, называемый некроптозом. Некроптоз – это форма клеточной гибели, вовлекающая RIP3 (взаимодействующая с рецептором серин / треонин-протеинкиназа от англ. receptor-interacting serine/threonine-protein kinase) и MLKL (псевдокиназа доменоподобного белка киназы смешанной линии от англ. mixed lineage kinase domain like pseudokinase). Как и в

случае апоптоза, в некроптозе участвует RIP1 киназа. В экспериментальных условиях для активации процесса некроптоза так же требуется ингибирование каспаз. Смерть клетки сопровождается повреждением мембраны и изливаним содержимого в окружающую среду (He et al., 2009; Sun et al., 2012; Zhao et al., 2012; Giampietry et al., 2014). Функцией некроптоза является защита от внутриклеточных инфекций, когда активация апоптоза невозможна, в том числе и по причине инактивации каспаз под влиянием патогена (Linkermann, Green, 2014).

Пироптоз – это воспалительная форма некротической гибели клеток. Медиаторами процесса являются каспазы 1 и 11. В результате процессинга предшественников, опосредованного каспазой 1, выделяются воспалительные цитокины IL-1 β и IL-18 (интерлейкин от англ. Interleukin), а разрушение мембраны, происходящее в процессе пироптоза, приводит к попаданию этих веществ в среду и воспалению (Zychlinsky et al., 1994; von Moltke et al., 2013).

Интенсивные исследования апоптоза были предопределены работами по определению рецепторов смерти и соответствующих им лигандов. Так, например, в начале 90-х годов прошлого века были идентифицированы фактор смерти и его рецептор – Fas лиганд (FasL) и Fas (фактор апоптотического семейства от англ. factor apoptosis superfamily), соответственно (Suda et al., 1993; Itoh et al., 1991). Эти работы совместно с открытиями многих других генов, регулирующих апоптоз, например, у дрозофил (White et al., 1994), нематод (Yuan et al., 1993; Hengartner, Horvitz, 1994) и млекопитающих (Vaux, Cory, Adams, 1988; Liu et al., 1996; Zou et al., 1997; Miura et al., 1993), показали существование двух основных сигнальных путей апоптоза.

В первом пути, известном как внешний, узнавание FasL FAS-рецептором приводит к конформационным изменениям последнего. В связи с этим FAS формирует мультипротеиновый комплекс, известный как DISC (индуцирующий смерть сигнальный комплекс от англ. death-inducing signaling complex), за счет взаимодействия с адапторным белком FADD и прокаспазой 8 (Chinnaiyan et al., 1995; Muzio et al., 1996; Kischkel et al., 1995). В данном комплексе прокаспаза процессируется в активную форму и, в свою очередь, активирует каспазу 3. Для более совершенной регуляции процесса активации апоптоза, гомолог каспазы 8, cFLIP способен связываться с каспазой 8 и FADD при этом ингибировать процесс клеточной смерти на данном этапе (Scaffidi et al., 1999). На этапе процессинга каспазы 8 ингибирующее действие посредством активации

cFlip может оказывать мембранный белок TOSO (молекула ингибирующая FAS зависимый апоптоз)(Hitoshi et al., 1998).

Во втором пути активации апоптоза, называемым внутренним, стимул, возникающий при развитии или генотоксический агент, приводят к митохондриальному или ЭПР (эндоплазматический ретикулум) стрессам, активируют проапоптотический компонент семейства BCL-2 (белок регулятор апоптоза В-клеточной лимфомы от англ. В-cell lymphoma 2). Белки семейства BCL-2 стимулируют митохондрии на выброс широкого спектра молекул, регулирующих апоптоз (Patterson et al., 2000). Среди них есть и цитохром С, который, совместно с прокаспазой 9 и АРАF1 (фактор активирующий апоптотические протеазы 1, от англ. apoptotic protease activating factor 1), формирует мультипротеиновый комплекс - апоптосому. При этом именно в результате его активности формируется зрелая форма каспазы 9 (Zou et al., 1999). Каспаза 9, как и каспаза 8, способна разрезать каспазу 3 до зрелой формы из ее предшественника. На этом этапе сигналинг двух различных путей активации апоптоза пересекается. В процессе апоптоза по внутреннему пути участвует и белок АIF (апоптоз индуцирующий фактор, от англ. apoptosis inducing factor), выбрасываемый из митохондрий. Этот протеин приводит к фрагментации ДНК (Joza et al., 2001). Необходимо упомянуть и белок p53, который участвует в регуляции этого пути апоптоза через влияние на семейство BCL-2 (Shuler, Green., 2001).

Для активации апоптоза каспаза 3 взаимодействует с более чем 500 различными внутриклеточными субстратами. Например, разрушение ДНК, при этом процессе, идет за счет Ca^{2+} и Mg^{2+} зависимых эндонуклеаз, разрезающих нуклеотидные цепочки до размеров 180-200 ПО (Bortner et al., 1995). Вовлечение же цитохрома с и АРАF1 в апоптотическую клеточную смерть было подтверждено *in vivo* с использованием мышинной модели (Hao et al., 2005; Yoshida et al., 1998; Nagasaka et al., 2010) и на дрозофилах (Mendes et al., 2006). Однако в этих же исследованиях была показана способность компонентов к независимой активации каспаз 3 и 9, что позволяет предполагать наличие неопознанных путей их активации и последующего апоптоза.

Используя мышинные линии, дефицитные по Fas и FasL, было показано, а позже подтверждено и в исследованиях на человеке, вовлечение нарушения этих генов в опосредованные Т-клетками аутоиммунные процессы (Takahashi et al., 1994; Madkaikar et al., 2011). Таким образом, эти данные в совокупности с пониманием FasL-FAS

системы, индуцирующей апоптоз извне, позволяют предполагать, что такой апоптоз вовлечен в уничтожение периферических Т-клеток. Кроме того, исследования апоптоза в В-клетках показали, что он защищает организм от аутореактивных В-клеток (Rathmell et al., 1995). В случае нехватки продуктов мышинового Bim (который так же известен как Bcl2l11 Bcl-2 подобный белок от англ. Bcl-2-like protein 11), являющегося компонентом внутреннего пути апоптоза, проявляются такие же патологии, как и при нарушении компонент внешнего пути (Bouillet et al., 1999). Таким образом, оба пути апоптоза критически важны для поддержания гомеостаза пула клеток иммунной системы. Кроме того, имеются данные об участии внутреннего пути регуляции апоптоза в контроле продолжительности жизни некоторых клеток миелоидного ряда, в частности эозинофилов, нейтрофилов и моноцитов (Kotzin et al., 2016).

Способность продуцировать FasL доступна не всем клеткам, а только ЦТЛ (цитотоксические Т-лимфоциты), Т-хелперам первого типа и ЕКК (естественные киллерные клетки) (Kägi et al., 1994). Экспрессия же FAS идет почти во всех клетках и различных тканях (Tanaka 1997). Таким образом, Т-клетки облегчают FAS-FasL опосредованную клеточную смерть.

В своем исследовании 1972 года Керг и соавт. обнаружили отсутствие воспаления и быстрое поглощение мертвых клеток фагоцитами. Впоследствии было показано, что поглощение происходит макрофагами, резидентными в данной ткани, а процесс назван эффероцитозом (Kawane et al., 2003). То, что макрофаги поглощают апоптотические клетки, но не трогают обычные, наводит на мысль о существовании специфического сигнала. Так, в одном из исследований, было показано наличие на поверхности апоптотических клеток фосфатидилсерина, что и являлось стимулом для эффероцитоза (Fadok et al., 1992). Так как наличие на поверхности апоптотических клеток фосфатидилсерина является их естественным маркером, то рационально использование его и в эксперименте. Он легко связывается с аннексином V, что и позволяет идентифицировать апоптотические клетки (Vermes et al., 1995).

Апоптотические клетки, после поглощения макрофагами, транспортируются в лизосомы, где все компоненты разрушаются на составные части. Разрушение и клеточных компонентов и ДНК хорошо изучены. Этот процесс весьма важен, так как наличие ДНК в цитоплазме клетки приводит к активации STING и последующей гибели клетки (Ishikawa, Ma, Barber, 2009).

В случае, если поглощение апоптотической клетки макрофагом не происходит быстро, начинается вторичный некроз. При этом клетка набухает и теряет целостность плазматической мембраны.

TNF (фактор некроза опухоли от англ, tumor necrosis factor) является веществом, способным стимулировать экспрессию генов, приводящую к воспалению. Сам же он продуцируется макрофагами в ответ на поражение вирусом или бактерией. В экспериментальных условиях, кроме воспаления, TNF способен индуцировать и апоптоз, и некроз, в особенности, если его наличию сопутствует ингибирование синтеза белка или РНК (Laster, Wood, Gooding, 1988). Молекулярные механизмы индукции апоптоза с помощью TNF и FasL схожи. Однако, TNF способен убивать клетки путем некроптоза, когда апоптотический сигналинг ингибирован. Индукция некроптоза с помощью TNF идет через активацию RIP1, что представляет ее как критический элемент сигналинга по данному пути (Degterev et al., 2005, 2008), однако можно добиться ингибирования некроптоза некростатином 1, что является проверкой специфичности на некроптоз. При некроптозе TNF связывается со своим рецептором на поверхности клетки, что стимулирует киназную активность RIPK1. Вслед за этим идет каскад активации киназ RIPK1-RIPK3-MLKL (Cho et al., 2009; He, Klionsky, 2009). MLKL псевдокиназа транслоцируется к плазматической мембране и повреждает ее, что и приводит к некрозу (Sun et al., 2012). В нормальных условиях TNF не убивает клетки. Однако в случае поражения клеток патогенами, когда процессы транскрипции и трансляции угнетены, их чувствительность к TNF индуцированной смерти растет. Кроме того, вирусы и бактерии часто провоцируют угнетение апоптоза, таким образом чувствительность пораженных клеток к TNF является резервным механизмом их элиминации.

В отдельный тип апоптоза, индуцированного внешним сигналом, относят процесс, идущий через перфорины и гранзимы. ЦТЛ образует пору на инфицированной клетке с помощью перфорины, а затем вбрасывает в нее гранулы с гранзимами (Trapani, Smyth, 2002). Этот путь может проходить через гранзим А или В. Активация апоптоза через гранзим В аналогична ранее описанным внешним и внутренним путям – активация каспазы 3 или цитохрома с (Barry, Bleaskey, 2002). При активации гранзима А идет сигналинг, приводящий к клеточной смерти по независимому от каспаз пути, и происходит повреждение однонитевых ДНК (Martinvalet, Zhu, Lieberman, 2005).

1.2 Клеточная смерть, инициируемая стрессом в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме

T-клетки подвергаются либо зависимому от рецептора смерти внешнему апоптозу, либо зависимому от митохондрий внутреннему апоптозу. По-видимому, существует значительное совпадение элементов сигналинга и перекрестная связь между вызванной ЭПР гибелью и внутренним апоптозом, поскольку оба они сильно зависят от семейства белков BCL2 с его многочисленными про- и антиапоптотическими членами (Hollien et al., 2009; Lee, Iwakoshi, Glimcher, 2003).

Семейство BCL2 включает как антиапоптотические (BCL2, BCLXL(продукт гена В-клеточной лимфомы XL от англ. B-cell lymphoma-extra-large)), так и проапоптотические белки (BAX, BAK и BID, хотя BID в основном участвует в апоптозе активируемом извне), которые являются очень гомологичными и имеют множественные BH-домены (BCL гомологи), несмотря на их взаимно антагонистические эффекты. Третья группа, которая связывает и блокирует BCL2 / BCLXL, имеет только общий домен BH3 (BIM, BAD, NOXA, PUMA) (Lin et al., 2007). Гены членов каждого из этих семейств представляют собой UPR-мишени, а изменения их уровней экспрессии в рамках стресс-реакции могут смещать баланс ближе к смерти, причем необратимо, если UPR пройдет успешно. BCL2, BAX и BAK были наиболее хорошо изучены в контексте их роли в UPR. При изучении смерти, вызванной стрессом ЭПР, было показано, что клетки ингибировали смерть за счет избыточной экспрессии BCL2 дикого типа или при наличии мутантного BCL2, нацеленного на ЭПР (Lee, Iwakoshi, Glimcher, 2003). Клетки, временно дефицитные по BAX и BAK одновременно, обладали повышенной устойчивостью к смерти при апоптотических стимулах (Heath-Engel, Chang, Shore, 2008). При этом, менее 10% мышей, дефицитных по обоим белкам, выживают благодаря той роли, которую апоптоз играет в нормальном развитии тканей, а выжившие демонстрируют значительные дефекты развития и аутоиммунные заболевания (Hacki et al., 2000; Youle, Strasser, 2008). В нормальных условиях BCL2 связывает BAX и BAK в ингибирующем комплексе. Снижение уровня экспрессии BCL2 устраняет подавление BAX и BAK. Это позволяет транслокацию BAX в митохондрии, а

также BAX - и BAK-зависимую пермеабиллизацию наружной мембраны митохондрий для выделения межмембранных белков, которые включают цитохром с и DIABLO (белок напрямую связывающийся с IAP от англ. direct IAP binding protein with low pI). Цитоплазматический цитохром С ассоциируется с APAF1 с образованием апоптосомы и инициирует активацию каспаз, – процесс, антагонизируемый ингибитором протеинов апоптоза (IAP от англ. inhibitors of apoptosis). С другой стороны, DIABLO блокирует функцию IAP, что обеспечивает олигомеризацию и аутопротеолиз каспазы 9, позволяющий ей активироваться. Активная каспаза 9, в свою очередь, расщепляет и активирует эффекторные каспазы 3, 6 и 7, которые инициируют расщепление ДНК, конденсацию хроматина, снижение потенциала митохондриальной мембраны и формирование апоптотического тела (Lin et al., 2007). Однако есть некоторые свидетельства того, что BCL2 в лимфоцитах также может регулировать апоптотический путь, который обходит митохондрии и не зависит от Araf1 и каспазы 9 (Wei et al., 2001).

Во время UPR, активированный PERK (протеинкиназо-R-подобная ЭПР киназа от англ. protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase) киназой, белок CHOP (транскрипционный фактор ССААТ последовательности от англ. ССААТ-enhancer-binding protein homologous protein) непосредственно снижает антиапоптотические уровни BCL2 при увеличении проапоптотической экспрессии BIM. Поскольку активация PERK также приводит к дефосфорилированию eIF2 α и возобновлению нормального синтеза белка, это сдвигает эффективный баланс про- и антиапоптотических белков BCL2 и BCLXL. Они подавляются, а уровни BAX / BAK возвращаются к исходному уровню. IRE1 (инозитол-требующий белок 1 от англ. Inositol-requiring enzyme 1) также оказывает прямое влияние на апоптоз через IRE1-TRAF2-зависимый рекрутинг ASK1 (киназа регулирующая апоптотический сигнал 1, от англ. Apoptosis signal-regulating kinase 1), являющийся критическим звеном между стрессом ЭПР и гибелью клеток (Mason et al., 2013; Lindsten et al., 2000). IRE1-TRAF2-ASK1 активирует JNK (c-Jun N-концевая киназа от англ. c-Jun N-terminal kinases), которая блокирует антиапоптотную активность BCL2 непосредственно путем фосфорилирования и косвенно путем высвобождения BIM из его ингибирующего комплекса с динеином и миозином. Всё это позволяет BIM связывать и ингибировать BCL2 (Marsden et al., 2002). Смерть, вызванная стрессом, также может возникать по митохондриально-независимым путям, обусловленным повышенной экспрессией и

прямой активацией ЭПР-ассоциированной каспазы 12 (каспаза 4 у людей). Каспаза 12 может быть расщеплена Ca^{2+} -зависимой цистеиновой протеазой кальпаином (Haatai et al., 2000) или каспазой 7, оба фермента активируются во время ЭПР-стресса. Удаление каспазы 12 спасает клетки от индуцированного стрессом ЭПР апоптоза, но не обеспечивает защиту от апоптоза, вызванного другими способами, например, антителами к FAS-рецептору (Nishitoh et al., 1998). Негативным регулятором этого пути каспазы 12 является экспрессия ЭПР-шаперона Hspa5 / Grp78, которая регулируется как часть UPR и, скорее всего, защищает от апоптоза, ингибируя активность каспазы 7 или каспазы 12. Тем не менее, каспаза 12 может не играть существенной роли в смерти, вызванной стрессом ЭПР, поскольку дефицит каспазы 12 (или каспазы 4) не останавливает процесс полностью (Nakagawa, Yuan, 2000).

1.3 Сенсор двухцепочечной ДНК и циклических динуклеотидов - STING

Стимулятор интерфероновых генов (STING, также известный как MPYS, *TMEM173*, ERIS или MITA) впервые был независимо идентифицирован в нескольких исследованиях, в трех из которых изучался воспалительный ответ, приводящий к продукции IFN типа I (Zhong et al., 2008; Ishikawa, Barber, 2009; Sun et al., 2009). В этих статьях авторы использовали метод экспрессионного клонирования для поиска генов, чрезмерная экспрессия которых активировала путь TBK1-IRF3 (TBK1 – серин-треониновая протеин киназа 1 от англ. TANK-binding kinase 1, IRF3 - регуляторный фактор интерферона 3 от англ. Interferon regulatory factor 3) и поэтому индуцировала IFN-ответы типа I. В каждом из этих исследований STING был идентифицирован в роли нового медиатора обнаружения нуклеиновых кислот. Кроме того, в данных статьях была показана зависимость продукции интерферонов в ответ на ДНК-вирусы от STING, а также независимость от STING TLR-опосредованных (толл-подобные рецепторы от англ. Toll-like receptor) ответов на ДНК в том случае, когда ген STING был нокаутирован. Последующие исследования показали, что сам STING не связывает ДНК напрямую, а опознает циклические динуклеотиды, получающиеся в результате расщепления ДНК нуклеазой cGAS (цикло-АМФ-ГМФ синтаза от англ. cyclic GMP-AMP synthase), взаимодействуя с другими, узнающими и связывающими ДН ДНК

белками, такими как DDX41, RIG-I и IFI16 (Ishikawa, Barber, 2009; Unterholzner et al., 2010; Zhang et al., 2011). Это взаимодействие приводит к последующей димеризации и олигомеризации STING, что активируют аутокиназу TBK1 и транскрипционный фактор IRF3. Но, несмотря на эти данные, есть сообщения о прямом взаимодействии STING-днДНК (Abe et al., 2013).

Кроме того, STING способен непосредственно узнавать и взаимодействовать с внутриклеточными циклическими динуклеотидами (цДН), состоящими из c-di-AMP, c-di-GMP и 3', 5'-cGAMP (Yin et al., 2012; Burdette et al., 2011), продуцируемыми бактериями, что приводит к IFN-I-зависимой защите от некоторых инфекций (de Almeida et al., 2011; Lippman et al., 2011) и повышенной восприимчивости к другим (Sauer et al., 2011). Изучение кристаллической структуры четко продемонстрировало прямое связывание STING с c-di-GMP (Shu et al., 2012) и подтвердило его роль в качестве сенсора цДН. Тем не менее, осталось неясным, какой компонент отвечает за связывание ДНК. Ответ на этот вопрос был получен после того, как была охарактеризована функция cGAS, как ДНК-связывающего фермента, который катализирует образование эндогенных цДН(2', 5'-c-di-GAMP у млекопитающих). Таким образом, cGAS является связующим звеном между специфическим связыванием STING с цДН и его способностью обнаруживать вирусную днДНК, обеспечивая защиту от многих ДНК- и ретровирусных инфекций (Dinner et al., 2013; Gao et al., 2013; Li et al., 2013; Schoggins et al., 2014). Последующие исследования расширили представления о функциях STING, включив в эту сферу обнаружение эндогенной ядерной и митохондриальной ДНК, образовавшихся в результате повреждения клеток (Rongvaux et al., 2014; Härtlova et al., 2015; Ahn et al., 2012; Ahn et al., 2014), а также паразитарной ДНК (Sharma et al., 2011).

Белки сигнального пути STING и cGAS являются высоко консервативными, а их эволюционные корни идут к хоанофлагеллятам (Wu et al., 2014). Одна аминокислота, отличающаяся в мышинном и человеческом STING, обуславливает одну, не решенную до сих пор, медицинскую проблему. Химиотерапевтическое средство 5,6-диметилксантенон-4-уксусная кислота (DMXAA), эффективный агент, индуцирующий интерфероновый ответ и разрушающий опухоли сосудистой системы, показал перспективы в лечении рака на мышинной модели, а также как противовирусное лекарственное средство. Однако в ходе клинических испытаний на человеке с

немелкоклеточным раком легких оказался неэффективным (McKeage et al., 2009). Фактическая мишень DMXAA оставалась неопознанной, пока не было обнаружено, что она непосредственно связывается только с мышинным STING и активирует его (Prantner et al., 2012; Conlon et al., 2013). А изучение кристаллической структуры STING выявило различия в аминокислотах между аллелями мыши и человека, которое предотвращало связывание человеческого STING с DMXAA (Gao et al., 2013; Gao et al., 2014). Последовавший за этим открытием синтез соединений, аналогичных DMXAA, но способных связывать человеческий STING (Tijono et al., 2013), возродил интерес к его потенциалу не только как к кандидату в противоопухолевые и противовирусные агенты, но и как к возможному адъюванту вакцин (Tang et al., 2013). На данный момент синтетические и встречающиеся в природе STING-связывающие цДН также используются в качестве потенциальных агентов, улучшающих иммунный ответ (Li et al., 2013; Škrnjug, Guzmán, Ruecker, 2014; Corrales et al., 2015).

1.4 Функции STING, не связанные с детекцией нуклеиновых кислот

Периодически публикуются данные о других функциях STING, не связанных с ДНК и циклическими динуклеотидами.

Так, работая с В-клетками, Jin и др. занимались поиском белков, преимущественно участвующих в активации апоптоза, а не воспалительного ответа, как в случае с МНС II (Jin et al., 2008). Результат исследований позволил идентифицировать трансмембранный белок, названный MPYS (который и оказался STING). Подобно тому, как в других публикациях был описан STING, они описали MPYS как белок, ассоциирующийся с митохондриальной мембраной, а также димеризующийся в процессе активации. Кроме того, была выявлена ассоциация STING с плазматической мембраной и поверхностными МНС II. К сожалению, это направление исследований не продвигалось, возможно, из-за того, что основное внимание уделялось роли STING в активации миелоидных клеток, а не В-клеток. siRNA нокдаун MPYS резко увеличивал выживаемость клеток в ответ на связывание с МНС II, тогда как прямое связывание с MPYS приводило к гибели клеток, что делает вышеописанные данные об их

взаимосвязи более достоверными (Jin et al., 2008). Что примечательно, экспериментальная сверхэкспрессия STING в MEF (мышинные эмбриональные фибробласты от англ. mouse embryonic fibroblasts) способна также вызвать гибель клеток, хотя это и может быть результатом цикла обратной связи IFN.

Еще одна связь между активацией STING и клеточной смертью была недавно описана в статье, демонстрирующей взаимодействие между IRE-1, ЭПР-стресс чувствительным белком (Urano et al., 2000) и STING. Активация данного пути, в конечном итоге, приводила к апоптозу по митохондриальному пути (Tang et al., 2016). Транслокация IRE-1 из ЭПР после воздействия стимула приводит к нетрадиционному сплайсингу и активации транскрипционного фактора XBP-1, что позволяет клетке преодолевать накопление белков, не прошедших фолдинг, или приводит к ее смерти (Kim et al., 2006). Эти данные свидетельствуют о связи между STING и клеточной смертью, связанной с ЭПР-стрессом.

Имеются данные, что при слиянии клеточной мембраны с вирусоподобными частицами, не содержащими нуклеиновых кислот или даже пустыми катионными липосомами, запускается зависящая от STING экспрессия ISGs (интерферонстимулирующие гены от англ. Interferon stimulating gen) (Holm et al., 2012). Слияние вирусных мембран активирует киназы PLC γ -PI3, что приводит к высвобождению ЭПР Ca²⁺. STING также осуществляет узнавание АФК (активные формы кислорода), которые образуются во время воспалительных реакций. Что интересно, вместо того, чтобы запускать продукцию IFN, в этом случае, происходит ингибирование сигнального пути (Holm et al., 2016). Таким образом, с течением времени появляется все больше вопросов о дополнительных функциях STING, независимых от его способности обнаруживать нуклеиновые кислоты. Постоянно увеличивается количество доказательств того, что он несет функции, не связанные с узнаванием нуклеиновых кислот и циклических динуклеотидов, что, безусловно, наводит на мысли о его полифункциональности.

1.5 Активация STING-опосредованного сигнального пути

STING находится на пересечении многих сигнальных путей, идущих от сенсоров цитоплазматической ДНК, и необходим для эффективного ответа IFN типа I на

последующих этапах сигналинга при обнаружении ДНК специализированными рецепторами (Hare et al., 2016). Несмотря на то, что биохимические исследования пути STING в основном проводились в моноцитах и клеточных линиях, предполагается, что механизм в других типах клеток на следующих после цДН-связывания этапах, является аналогичным. Кристаллизация белка показала, что в отсутствие лиганда STING существует как симметричный димер (Shu et al., 2012; Gao et al., 2013; Cheshenko et al., 2003; Jin, Lenz, Cambier, 2010; Paludan, Bowie, 2013), локализованный в ЭПР (Zhong et al., 2008; Ishikawa, Barber, 2009; Sun et al., 2009), однако имеются данные об его связывании с МНС II в В-клетках (Jin et al., 2008). Хотя многие из этих исследований указывают на конформационный сдвиг от открытого до закрытого и активированного состояния в STING после связывания лиганда, некоторые исследователи утверждают, что это артефакт кристаллизации. Вместо этого они предлагают лигандсвязывающие триггеры диссоциации домена связывания цДН и автоингибирующего С-концевого хвоста STING (Yin et al., 2012). После активации STING транслоцируется из ЭПР в соседние отсеки ЭПР-Гольджи, что является очень важным для его функции. Когда сигналы удерживания эндоплазматическим ретикулумом подаются в С-концевой домен STING, продукция IFN типа I ингибируется (Sun et al., 2009; Ouyang et al., 2012), и, наоборот. Так, человеческие мутации, вызывающие постоянную транспортировку STING из ЭПР, приводят к аутоиммунным заболеваниям, обусловленным высокими уровнями IFN типа I (Shang, 2012). STING мигрирует к точке фосфорилирования TBK1, этот процесс, отрицательно регулируется аутофаговым белком Atg9a (хотя эти цитоплазматические структуры не являются классическими аутофагосомами), о чем свидетельствует усиленная транскрипция ISGs и IFN β в Atg9a - / - MEFs (Ouyang et al., 2012; Huang et al., 2012). STING-опосредованный сигналинг также контролируется другим белком, связанным с аутофагами, ULK1 (Unc-51 подобная киназа активирующая аутофагию от англ. Unc-51 like autophagy activating kinase). cGAMP (гуанозин-аденозин монофосфат от англ. guanosine-adenosine monophosphate) снимает подавление ULK1, которое ведется AMPK, позволяя ему фосфорилировать STING и направлять его на деградацию (Saitoh et al., 2009). Деградация STING затем запускает растворение комплекса TBK1-IRF3, чтобы предотвратить сигналинг и ответ IFN типа I, вредный для хозяина.

Необходимо отметить, что транслокация STING нужна для его участия в пути TBK1-IRF3, который не является эксклюзивным для STING и управляет ответами IFN типа I, участвуя в нескольких PRR сигнальных путях, связанных активацией посредством нуклеиновых кислот. Транслоцированный STING фосфорилирует TBK1, который, в свою очередь, фосфорилирует IRF3, чтобы обеспечить его димеризацию, попадание в ядро и инициирование транскрипции ISGs, а позже и продукцию IFN типа I (Dobbs et al., 2015; Saitoh et al., 2010). Также было показано, что STING-зависимая активация TBK1 вызывает канонический сигналинг NFκB (ядерный фактор «каппа-би» от англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) и фосфорилирование ERK (киназа регулируемая внеклеточным сигналом от англ. extracellular signal-regulated kinases), p38 и JNK, что приводит к получению дополнительных воспалительных цитокинов (Abe et al., 2013; Konno, Konno, Barber, 2013). Видимо вследствие того, что активация NFκB лежит в русле сигнальных путей широкого спектра PRR (pathogen recognition receptors, патоген распознающие рецепторы), и ее результаты могут быть более вариативными, чем относительно прямой путь STING-TBK1-IRF3-IFN-I, он получил меньше внимания, чем IRF3-IFN путь. Однако активация NFκB может оказаться не менее важной, так как функции STING познаются все шире. Например, в публикации о связи STING с МНС II в В-клетках было показано, что STING-зависимая активация ERK, необходима для индукции клеточной смерти. Однако это исследование не учитывало возможности участия TBK1-IRF3 в смерти, и была ли смерть связана с продукцией IFN типа I (Jin et al., 2008).

1.6 Активация Т-клеток

Связывание представленного комплексом гистосовместимости антигена Т-клеточным рецептором инициирует сложный каскад сигнальных путей. Наиболее важными событиями являются быстрое изменение концентрации Ca²⁺ и активация NFκB и MAPK ниже по пути сигналинга от ТКР, так как оба могут взаимодействовать с сигналингом, идущим через STING.

В последнее время было показано, что Ca²⁺ является универсальным вторичным мессенджером в эукариотических клетках и его важнейшая функция это сигналинг в лимфоцитах, в частности, активация ТКР / ВКР (В-клеточные рецепторы) (Sharma et al.,

2003; Fitzgerald et al., 2003). В Т-клетках связывание комплекса пептид-МНС с ТКР активирует киназы Lck и Fyn, которые фосфорилируют CD3 ITAM (активационный тирозинсодержащий мотив иммунорецепторов от англ. An immunoreceptor tyrosine-based activation motif) для набора и активации Zap70. Zap70 фосфорилирует LAT (линкер для активации Т-клеток от англ. linker for activation of T cells), а адаптерный комплекс LAT / SLP76 (лимфоцитарный цитозольный протеин от англ. SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa), в свою очередь, опосредует фосфорилирование фосфолипазы PLC γ 1. PLC γ 1, вместе с PLC β ниже по сигнальному пути от связанных с G-белком рецепторов, гидролизует мембраны Ptdins P2 для генерации InsP3 и DAG (диацилглицерол от англ. Diacylglycerol). Первый связывается с рецептором на мембране ЭПР, что приводит к высвобождению Ca $^{2+}$, а последующее снижение концентрации Ca $^{2+}$ в ЭПР определяется STIM1 и STIM2 (молекула стромального взаимодействия от англ. Stromal interaction molecule). Активированные Ca $^{2+}$ -каналы (CRAC (от англ. Calcium release-activated channels)), инициируют приток Ca $^{2+}$. Это увеличивает цитоплазматическую концентрацию Ca $^{2+}$, что в наибольшей степени приводит к активации NFAT (ядерный фактор активации Т-клеток от англ. Nuclear factor of activated T-cells), CREB и NF κ B, хотя Ca $^{2+}$ -независимый сигналинг ниже по сигнальному пути от ТКР также активирует NF κ B. Ингибирование притока Ca $^{2+}$ путем делеции STIM1 в Т-клетках специфически предотвращает продукцию IL-2, необходимую для распространения активированных Т-клеток, при этом, не влияя на экспрессию маркеров активации CD69 и CD25. Это подчеркивает кооперативную природу ветвей сигналинга ТКР (Abe, Barber, 2014). Интересно то, что если активировать Ca $^{2+}$ путь фармакологически, или другими факторами, которые препятствуют взаимодействию NFAT с его транскрипционным фактором AP-1, то сегмент генов, на которые влияет NFAT, будет отличаться от обычной стимуляции ТКР, а также будет наблюдаться рост клеточной смерти (Abe, Barber, 2014; Feske, 2007). DAG, второй продукт, образующийся при активации Ptdins (4,5) P2, активирует путь Ras / Raf для фосфорилирования ERK1 / 2 и активирует STAT3 и AP-1. Активация киназы PKC θ , критического регулятора передачи сигналов NF κ B в Т-клетках, также находится ниже от DAG на сигнальном пути. PKC θ впоследствии фосфорилирует CARMA1 (содержащая домен активации каспаз, мембрано-ассоциированная гуанилат киназа 1 от англ. Caspase recruitment domain-containing membrane-associated guanylate kinase protein-1), чтобы обеспечить образование

комплекса CARMA1-Bcl10-MALT1, который облегчает высвобождение ИКК γ (ИкВ киназа от англ. I κ B kinase) из его регуляторной субъединицы и позволяет ему фосфорилировать ИкВ. Это, в свою очередь, приводит к деградации ингибирующего NF κ B ИкВ и транслокации NF κ B в ядро (Sharma et al., 2003; Fitzgerald et al., 2003; Lewis, 2001; Oh-Hora et al., 2008).

Зависимость Т-клеток от сигналинга, опосредованного Ca²⁺, наиболее интересна на этапе, где сигналы STING и ТКР могут влиять друг на друга. Так, выход STING из места его нахождения в ЭПР, является ключом к его активации по пути TBK1-IRF3. Разумеется, лиганд-независимый сигналинг STING может быть вызван нарушениями или изменениями в микроокружении ЭПР, если они приводят к выбросу STING. В связи с этим активаторы, способствующие стресс-индуцированию ЭПР, такие как тапсигаргин, усиливают продукцию IFN γ , индуцированную LPS (липополисахарид от англ. Lipopolysaccharide), по пути STING-опосредованного сигналинга. Однако, иономицин, который изменяет концентрации ЭПР Ca²⁺, не индуцирует стресс, как было показано для других подобных соединений, что удивительно (Macián et al., 2002).

Два дополнительных пересечения сигналинга STING и ТКР находятся на уровне активации MAPK / ERK (MAPK - митоген-активируемая протеинкиназа от англ. mitogen-activated protein kinase) и сигналинга NF κ B ниже по пути от Ras / Raf в Т-клетках. Поэтому активация STING в Т-клетках, реагирующих на пептид-МНС, может неспецифически усилить реакцию, что приведет к интенсивным сигналам и иницированию активации индуцированной гибели клеток. Так же, при таком усилении, возможна реакция Т-клеток на более слабые сигналы, которые в противном случае были бы ниже порога активации. Комбинированная стимуляция STING и ТКР, вероятно, может влиять на дифференцировку или поляризацию Т-клеток другими способами, которые, на данный момент, не изучены.

1.7 Т-клетки и Toll-подобные рецепторы (TLR)

Существует широкий спектр PRR, которые обнаруживают неспецифические сигналы опасности, чтобы вызвать немедленный иммунный ответ «первой линии», одновременно иницируя антиген-специфический адаптивный иммунный ответ. STING, обладая способностью распознавать цДН, является одним из них. В то время как PRR

обладают большой способностью к обнаружению опасности, ТКР и ВКР-активация с помощью APC (антиген представляющие клетки, от англ. antigen-presenting cell), представляющих МНС и экспрессии костимулирующих молекул, является высокоспецифичной. Последняя также приводит к адаптивному иммунному ответу, более приспособленному к конкретной угрозе и развитию иммунологической памяти. Роли, выполняемые клетками различных уровней иммунного ответа, контрастируют друг с другом по способам их активации, но тонкая грань, разделяющая их, распознается всё четче. Способность адаптивных ответов быть более системными, стойкими и мощными, чем локализованные врожденные ответы, может помочь объяснить более жесткие требования для их активации. Тем не менее, было показано, что Т-клетки экспрессируют ДНК PRR (Smith-Garvin, Koretzky, Jordan, 2009), возможно, для самозащиты от вирусной инфекции. Также известно, что активация PRR при определенных обстоятельствах модулирует ответы этих клеток (Brownlie, Zamoyska, 2013; Liu et al., 2012).

Из PRR, TLR наиболее изучены на примере Т-клеток: как мышинные, так и человеческие CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, которые, как сообщается, экспрессируют TLR2, 3, 4 и 5 типа на уровне белка и/или мРНК (матричная рибонуклеиновая кислота)(Liu et al., 2012). Кроме того, у Т-клеток человека, экспрессия TLR ниже, чем в CD14⁺ моноцитах (Monroe et al., 2014). Эти данные вносят дополнительные вопросы о функции TLR в Т-клетках, так как наличие контаминирующих APC (antigene presenting cell, антиген презентирующие клетки) приводит к ответам на TLR-лиганды. Уровень этой реакции уменьшается или исчезает полностью при использовании более качественных методов очистки и разделения (Oberge et al., 2011). Тем не менее, авторы большинства статей, судя по всему, согласны с тем, что ген TLR и экспрессия кодируемого им белка присутствуют в Т-клетках и увеличивается при активации ТКР.

В отличие от APC, наивные Т-клетки практически не чувствительны к стимуляции лигандами TLR в чистом виде. В случае с эффекторными клетками и клетками памяти, это может служить в качестве костимулирующего фактора сочетанного со стимуляцией ТКР. Так, было показано, что добавление агонистов TLR - poly (I: C) или CpG к активированным CD4⁺ Т-клеткам повышает их выживаемость, но не усиливает пролиферацию. Возможно, это происходит из-за увеличения экспрессии антиапоптотического белка BCLXL (Kulkarni, Behboudi, Sharif, 2011). В одном из

исследований было показано, что CpG также может синергизировать с низкими уровнями анти-CD3, что приводит к пролиферации Т-клеток, эквивалентной комбинации анти-CD3 и анти-CD28 (Zarembek, Godowski, 2002), а также активации TLR9- и MyD88-зависимому (цитозольный адаптерный белок от англ. Myeloid differentiation primary response gene 88) выходу из подавления Treg (Lancioni, Thomas, Rojas, 2009). В периферических Т-клетках человека стимуляция TLR1 / 2 (Pam3CSK4), TLR5 (flagellin) и TLR7 / 8 (resiquimod) в сочетании с низкими уровнями анти-CD3, анти-CD28 или IL-2 не только усиливала пролиферацию, но и увеличивались уровни IFN γ , IL-8 и IL-10. Ответ был еще сильнее выражен, когда исследователи использовали изолированные эффекторные Т-клетки (Gelman et al., 2004).

Считается, что TLR-лиганды оказывают значительное влияние на регуляторные Т-клетки. Так первые данные о функции TLR в этой популяции, показали, что они экспрессировали TLR4 (что было оспорено позднее) и что воздействие LPS усиливало пролиферацию изолированных CD4⁺ CD25⁺ клеток Treg, а добавление наивных CD4⁺ CD25⁻ Т-клеток усиливало их способность к подавлению (Gelman et al., 2006). Указанные эффекты, зависят и от концентрации. Например, высокие концентрации флагеллина (лиганд TLR5), добавленного к субоптимальной стимуляции анти-CD3, индуцировали пролиферацию и производство IL-2 общими CD4⁺ Т-клетками, более низкие концентрации, в основном, усиливали регуляторное подавление распространения Т-клеток (LaRosa et al., 2007). Это явление может быть частично объяснено более высокими уровнями экспрессии TLR, что показано в работе на популяции Treg. Тем не менее, в одном из исследований подавляющей функции Treg человека, она усиливалась в ответ на группу агонистов TLR2 в клетках некоторых доноров, но уменьшалась у других, возможно, в результате генетической разнородности (Caron et al., 2005).

Помимо обширного спектра влияния на активацию и пролиферацию Т-клеток со стороны TLR, дифференциация CD4⁺ Т-клеток также связана с этими рецепторами, в результате чего развитие клеток Th1 и продукция IFN γ могут усиливаться (Caramalho et al., 2003). Основываясь на этих данных, были исследованы эффекты различных олигонуклеотидов, таких как TLR9-лиганды на CD4⁺ Т-клетках. В итоге было обнаружено, что они усиливают синтез IFN γ , IL-2 и, в меньшей степени, продукцию IL-17 при добавлении к анти-CD3 или анти-CD3 / CD28 стимулированным человеческим Т-клеткам. Интересно, что эти эффекты не зависели от экспрессии MyD88 или TLR9.

Таким образом, наблюдаемые изменения могли быть опосредованы другими внутриклеточными PRR.

Литературных данных по активации цитоплазматических ДНК-сенсоров Т-клеток исчерпывающе мало. В одной из статей по теме не было обнаружено ни индукции ISGs, ни усиления подавления ВИЧ-инфекции (ВИЧ - вирус иммунодефицита человека), когда человеческие CD4⁺ Т-клетки трансфецировали с помощью онДНК или днДНК (Oberг et al., 2010). Однако позже было показано, что цитоплазматический сенсор нуклеиновой кислоты IFI16 способен узнавать ВИЧ () в тонзиллярных Т-клетках и вызывать их каспазо-зависимую гибель (Smith-Garvin, Koretzky, Jordan, 2009). То, что это исследование не выявило роли STING в процессе, может быть объяснено отсутствием обнаруживаемого cGAS в этой популяции клеток.

Несмотря на то, что PRR в Т-клетках изучены не столь детально, как в миелоидных или В-клетках, имеющиеся данные позволяют утверждать, что эти рецепторы могут модифицировать поведение адаптивных иммунных клеток.

1.8 Т-клетки и интерферон первого типа (IFN типа I)

Т-клетки, не являясь основным источником IFN α / β , подвергаются его влиянию (MacLeod, Wetzler, 2007). Непрямые эффекты влияния IFN типа I на Т-клетки обусловлены тем, что IFN типа I активирует APC, а они, в свою очередь, Т-клетки. Большинство из работ по этой теме рассматривают антиген-презентирующие дендритные клетки, как основной активатор Т-клеток (Landrigan, Wong, Utz, 2011). IFN типа I индуцирует быстрое созревание DC (дендритные клетки от англ. Dendritic cells), сохранение, презентацию антигена и транспорт до лимфатических узлов для взаимодействия с Т-клетками (Tough, 2012; Berg et al., 2014; Inaba et al., 1990). IFN типа I также вызывает выработку DC CCL18 (CC хемокиновый лиганд 18 от англ. CC chemokine ligand 18), который способствует рекрутированию наивных Т-клеток в DC (Hu, Ivashkiv, 2006). Примечательно, что DC от мышей IFNAR^{-/-} (IFNAR – интерферон- α/β рецептор от англ. The interferon- α/β receptor) демонстрируют уменьшение экспрессии костимулирующих и адгезионных молекул (Parlato et al., 2001). В связи с этим,

базальный сигналинг IFN типа I может влиять на способность DC эффективно взаимодействовать с Т-клетками и активировать их.

Кроме общего эффекта, влияющего на взаимодействия Т-клетка-АПС, IFN типа I индуцирует продукцию цитокинов в DC. Эти цитокины могут влиять на дифференцировку CD4 + Т-клеток. В частности, продукция IL-15 (Tough, 2012), IFN- γ и IL-12 (Hervas-Stubbs et al., 2011) дендритными клетками в ответ на IFN α / β связана с дифференцированием Th1, тогда как активация IFNAR в DC индуцирует продукцию IL-27, который активно подавляет развитие клеток Th17 (Adema et al., 1997). Эти эффекты могут быть синергичны, поскольку клетки Th1 и Th17 могут реципрокно взаимодействовать друг с другом и составлять часть механизма, лежащего в основе эффективности воздействия IFN β при множественном склерозе (Monotoya et al., 2002; Agarwal et al., 2009). Однако следует помнить, что возможны прямые эффекты IFN типа I на Т-клетки.

Наибольший эффект IFN типа I оказывает на CD8⁺ дендритные клетки. Эта популяция Т-клеток отвечает за перекрестное представление антигена и продуктивную кросс-активацию CD8⁺ Т-клеток (Shinohara et al., 2008). Производство IFN типа I в опухолях, например, идет в ответ на активацию STING с помощью опухолевых ДНК, и ведет к внутриопухолевому накоплению и активации CD8⁺ DC, первичной популяции DC, ответственной за стимуляцию спонтанной активации CD8⁺ Т-клеток для содействия отторжению опухоли (Axtell, Raman, Steinman, 2013; Kavrochorianou et al., 2016). Весьма важно то, что при этом иммунорегуляторная среда опухоли все еще может противостоять успешному отторжению. Аналогично, вирусная инфекция, при которой единственным источником IFN α / β может быть активированный STING, позволяет напрямую активировать CD8⁺ Т-клетку с помощью антиген-перекрестного представления DC, при этом помощь CD4⁺ Т-клеток не требуется (Kurta et al., 2001).

Влияние IFN типа I на ответы Т-клеток под действием на них АПС могло бы исторически привлечь больше внимания. Свою роль в этом сыграло то, что, как и все ядерные клетки, Т-клетки экспрессируют рецепторы IFN типа I и являются прямыми мишенями IFN α / β . Именно этот факт обуславливал то, что наличие уникальных реакций не предполагалось. Изначально было обнаружено, что IFN α / β непосредственно предотвращает гибель Т-клеток во время воспаления (Lorenzi et al., 2011; Fuertes et al., 2011). Последующие же исследования показали, что иммунитет Т-

клеток и ответы на Т-зависимые антитела усиливались в присутствии $IFN\alpha / \beta$. Интерферон при этом вводился в виде вакцины, в рекомбинантной форме (Le Bon et al., 2003) или синтезировался эндогенно, как ответ на адьюванты, такие как полный адьювант Фрейнда (Marrack, Kappler, Mitchell, 1999). Подобным образом $IFN\alpha / \beta$, продуцируемый APC, способствует выживаемости $CD4+$ и $CD8+$ Т-клеток во время вирусной инфекции. Именно этот сигнал может быть критическим для клональной экспансии и последующего развития эффекторных клеток и Т-клеток памяти. Специфичность этого эффекта была подтверждена в опытах с мышами, дефицитными по $IFNAR$, и имевшими $CD4+$, $CD8+$ Т-клетки, специфичные к антигену LCMV (вирус лейкоцитарного хореоменингита от англ. Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus). $IFNAR$ -дефицитные Т-клетки сильно меняют специфичные Т-клеточные ответы на вирус, тогда как ответы Т-клеток на бактериальную инфекцию остаются прежними (Marrack, Kappler, 2004; Proietti et al., 2002). Немаловажно то, что эти эксперименты показали увеличение выживаемости Т-клеток под действием IFN типа I. В обоих исследованиях начальная вирусная специфическая активация и пролиферация $CD4+$ и $CD8+$ были нормальными, но клетки продолжали выживать после реакции активации.

В других случаях, $IFN\alpha / \beta$, по-видимому, обладал иммунорегуляторным эффектом, в частности, когда смесь мышинных OVA-специфических и неспецифических Т-клеток стимулировалась OVA APC и поли (I:C), чтобы индуцировать IFN типа I. В результате экспрессия Foxp3 индуировалась сильнее и повышалась подавляющая способность неспецифических клеток, которая исчезла при использовании $IFNAR^{-/-}$ Т-клеток (Le Bon et al., 2001). При использовании мышинной модели авторы также обнаружили снижение отторжения опухоли вследствие усиления развития Treg. Аналогичным образом, на модели лимфопролиферативного заболевания *in vivo* было показано, что экспрессия $IFNAR$ у Treg необходима для блокировки экспансии Т-клеток и преодоления летальности (Havenar-Daughton, Kolumam, Murali-Krishna, 2006). У мышей с постоянно высокими уровнями $IFN\beta$ вследствие нокаута TREX1, пролиферация и активация Foxp3 + Treg была заблокирована в то время, когда активация и пролиферация Teff была усилена. Так как наблюдаемые эффекты зависели от наличия $IFNAR$, был сделан вывод о том, что они проявляются опосредованно $IFNAR$ (Kolumam et al., 2005; Thompson et al., 2016). Являются ли эти данные связанными с ранними сообщениями об ингибировании пролиферации, описанными при активации Т-

клеток митогенами и IFN α , неясно (Metedji et al., 2015; Srivastava, Koch, Campbel, 2014; Srivastava et al., 2014), но, разумеется, разница связана со временем воздействия IFN типа I, а также относительной силой активирующего сигнала.

Также было показано, что IFN α / β могут приводить к увеличению смертности Т-клеток и снижать ответ Т-клеток. В одной из статей о влиянии IFN типа I на Т-клетки, активированные фитогемагглютинином в реакции смешанных лимфоцитов, было показано, что IFN ингибирует пролиферацию Т-клеток (Metedji et al., 2015). В двух дополнительных исследованиях с использованием рекомбинантной плазмидной ДНК и очищенных Т-клеток у здоровых доноров (Srivastava, Koch, Campbel, 2014) и пациентов с множественным склерозом (Srivastava et al., 2014) обнаружили повышенную гибель клеток. Она была связана с повышением экспрессии Fas / FasL в результате индукции IFN α . Использование отличных от ТКР средств активации, например митогенов или чужеродных МНС, в этих исследованиях, могло бы пролить свет на это противоречие.

В другом исследовании было показано, что обработка ТКР стимулированных Т-клеток с помощью IFN α способствовала снижению уровня PD-1. Это приводило к нарушению отторжения опухоли на мышинной модели, но эффект снимался при блокировке PD-1. Стоит отметить, что в этом исследовании не было отмечено влияния IFN α на смерть Т-клеток. Важным отличием этого эксперимента было время, при котором добавляли IFN α после стимуляции ТКР. Также немаловажно, что STING-зависимое продуцирование IFN типа I макрофагами в ответ на инфекцию *Listeria monocytogenes* (Kaser, Nagata, Tilg, 1999) повышало чувствительность Т-клеток к Listeriolysin O (бактериальный белок, приводящий к лизису фагосом), вызывая увеличение смертности Т-клеток (Sharief, Semra, 2002). В совокупности эти исследования показывают, что эффекты IFN типа I на выживаемость и пролиферацию Т-клеток не являются постоянными, а зависят от времени и специфического стимула активации Т-клеток.

В дополнение к широкому спектру эффектов, оказываемых на функцию Т-клеток, IFN типа I также оказывает специфическое действие на подклассы CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ Т-клеток. В модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ), в которой Т-клетки экспрессируют только IFNAR, начало болезни и тяжесть смещаются на более поздний период и снижаются, когда клетки или мыши обрабатываются IFN α / β . Это коррелирует со значительным снижением периферических Th17-продуцирующих

клеток до развития симптомов (Burdette et al., 2011). Несмотря на отсутствие различий в клетках Th17 во время острой фазы, авторы обнаружили увеличение IL-10- и IFN-позитивных клеток. При обработке человеческих Т-клеток с помощью IFN α / β ингибировалась экспрессия транскрипционного фактора GATA3 в условиях Th2-поляризации, блокируя продукцию IL-4 и функционирование Th2; при этом в мышинных Т-клетках такого эффекта не наблюдалось (Terawaki et al., 2011). Также было показано, что в CD8+ Т-клетках сигналинг IFN типа I (или, альтернативно, IL-12) после активации ТКР и костимуляции APC необходим для выживания, развития функциональных эффекторов и ячеек памяти (Hervas-Stubbs et al., 2011).

В целом, IFN типа I, по-видимому, оказывает широкое, но, при этом, противоречивое влияние на пролиферацию, смерть и эффекторную функцию Т-клеток. Могут ли такие эффекты также возникать в результате образования IFN самими Т-клетками при стимуляции PRR, на данный момент не выяснено.

1.9 Стресс эндоплазматического ретикулума и реакция на несвернутые белки клетки

UPR (unfolded protein response) активируется в ответ на ЭПР-стресс и позволяет клеткам справляться с перегрузкой или блокированием синтеза белка и его фолдинга. Такие условия могут возникать после активации Т-клеток, поскольку клетка быстро наращивает производство белка, чтобы пролиферировать и синтезировать цитокины. Критической функцией ЭПР является правильный фолдинг белка, а изменения среды ЭПР, препятствуют ему. Такие изменения, как доступность Ca²⁺ или АТФ (аденозинтрифосфат), или нарушения окислительно-восстановительного статуса, препятствуют образованию дисульфидных связей. Слишком низкое количество доступных складчатых шаперонов могут вызвать накопление несоизмеримых или агрегированных белков, которые становятся токсичными для клетки (Archer, Durak, Portnoy, 2014; Carrero, Calderon, Unanue, 2004; Huber et al., 2010). Для преодоления ЭПР-стресса клетки должны снизить синтез белка и разрушить белки, которые не могут пройти сборку (иногда требуется некоторая степень ЭПР-аутофагии (Kaufman, 2002), одновременно увеличивая ER-емкость, расширяя размер ЭПР и пул складчатых шаперонов. Также необходимо изменение биохимического микроокружения, которое

мешают правильному фолдингу. Непреодоленный и/или хронический ЭПР-стресс, в конечном итоге, приведет к апоптозу (Walter, Ron, 2011; Gaut Hendershot, 1993).

Три трансмембранных белка в основном ответственны за обнаружение стресса ЭПР и иницирование UPR: PERK, ATF6 (фактор активации транскрипции 6 от англ. Activating transcription factor 6) и IRE1. Вместе эти белки опосредуют комплексный ответ с несколькими целями: некоторые из них уникальны для каждого, в то время как другие перекрывают друг друга или иницируют другие ответы. Каждая ветвь также имеет циклы обратной связи для отключения UPR при возобновлении нормального функционирования ЭПР (Bernaies, McDonald, Walter, 2006).

Считается, что наиболее быстро активируется в ответ на стресс ЭПР киназа PERK. Она подвергается аутофосфорилированию, когда обнаруживает UPR и способна активировать пути, приводящие к выживанию клетки, а также реакции, которые приводят к смерти (Tabas, Ron, 2011; Szegezdi et al., 2006). Активированная PERK фосфорилирует регуляторную субъединицу eIF2 киназного комплекса eIF2 α . Это критический шаг, который снижает трансляцию белка, чтобы уменьшить перегрузку ЭПР и уменьшить шанс гибели клеток (Ron, Walter, 2007). В то же время p-eIF2 α иницирует транскрипцию окислительных стресс-восстанавливающих генов и переносчиков аминокислот, освобождает рибосомы и трансляционные белки и может усилить экспрессию гена IRE1-регулируемого UPR (Haze et al., 1999). В отличие от других ветвей UPR, сигналинг по ветви p-eIF2 α также может быть вызван другими нагрузками на клетку, включая лишение питательных веществ, гипоксию, а, в некоторых случаях, вирусную инфекцию (Harding, Zhang, Ron, 1999). Поскольку окончательное восстановление нормального синтеза белка после устранения нагрузки столь же важно для выживаемости клеток, как и первоначальная блокировка трансляции белка, p-eIF2 α жестко регулируется отрицательной обратной связью, в первую очередь посредством экспрессии CHOP (GADD153) и его целевого GADD34 (белок индуцибельный ограничением роста и повреждением ДНК от англ. growth arrest and DNA damage-inducible protein). GADD34 взаимодействует с фосфатазой PP1 α , которая нацеливает его на eIF2 α , что приводит к дефосфорилированию eIF2 α . Таким образом, восстанавливается ингибирование комплекса eIF2, чтобы обеспечить возобновление нормального синтеза белка (Harding et al., 2000).

ATF6, второй компонент ответственный за стресс ответ, удерживается привязанной к мембране эндоплазматического ретикулума областью, которая связывает шаперон фолдинга BiP (связывающий иммуноглобулин белок от англ. Binding immunoglobulin protein) внутри эндоплазматического ретикулума. Избыток белка эффективно погружает BiP в эндоплазматический ретикулум, и результирующая диссоциация BiP от ATF6 дает сигнал для транспорта BiP в аппарат Гольджи и последующего протеолиза (Tabas, Ron, 2011). После диссоциации, ДНК-связывающий фрагмент, ATF6f, смещается в ядро и активирует плохо охарактеризованное подмножество генов UPR. Считается, что многие из эффектов активации ATF6 перекрываются с IRE1 или дополняют их.

IRE1 содержит люменальный домен, аналогичный и экспериментально взаимозаменяемый с помощью PERK (Szegedzi et al., 2006). Он аналогичным образом активируется связыванием UPR в просвете ЭПР. Активированный IRE1 сам олигомеризуется и фосфорилируется (Scheuner et al., 2001; Harding et al., 2003). Эндорибонуклеазный домен активированного IRE1 вытесняет интрон из транскрипционного фактора XBP1 (белок связывающийся с X боксом от англ. X-box binding protein 1), чтобы обеспечить транспорт в ядро XBP1, который способен индуцировать транскрипцию генов-мишеней UPR после прохождения сплайсинга. Из активированных транскрипционных факторов UPR sXBP1, в частности, отвечает за увеличение экспрессии шаперонов в соответствии с потребностями эндоплазматического ретикулума (Brush, Weiser, Shenolikar, 2003; Shamu, Walter, 1996). При длительном стрессе и увеличенной экспрессии IRE1, он становится менее XBP1-специфичным, по-видимому, потому, что количество IRE1 начинает превышать XBP1 и начинается комплексообразование и деградация мембранно-ассоциированной с эндоплазматическим ретикулумом мРНК, что дополнительно уменьшает белковую нагрузку на эндоплазматический ретикулум (Gardner, Walter, 2011). В некоторых исследованиях предполагается, что это также способствует апоптозу, уменьшая экспрессию транскриптов, повышающих выживаемость (Walter, Ron, 2011). Подобно PERK-активации CHOP, который возвращает назад и отрицательно регулирует фосфорилирование eIF2, sXBP1 образует цикл обратной связи, индуцируя увеличенную транскрипцию XBP1. Вновь созданный XBP1 связывает sXBP1, ингибируя его, уменьшая количество sXBP1, доступного для использования в качестве фактора

транскрипции. sXBP1 дополнительно регулирует UPR, увеличивая экспрессию P58^{IPK}, отрицательного регулятора PERK, который усиливает дефосфорилирование eIF2 α (Yoshida et al., 2001). Было показано, что время, необходимое для активации IRE1 относительно PERK является более поздним в сигнальном пути UPR, так что вместимость белков в ЭПР теоретически увеличивается к тому времени, когда удаляется трансляционный ингибитор (Gaut, Hendershot, 1993). Тем не менее, возобновление нормальной трансляции несет в себе повышенный риск гибели клеток, поскольку производство проапоптотических белков может увеличиваться, смещая баланс выживаемости клеток.

Таким образом, IRE1, ATF6 и PERK имеют двоякую роль, участвуя в разной степени в иницировании ответов для устранения стресса и в то же время в начале процесса саморазрушения, в случае, если UPR потерпит неудачу. В конце концов, судьба клеток определяется постоянством напряженного состояния и балансом активации ветвей UPR (Calton et al., 2002).

1.10 Белок cFLIP

cFLIP является гомологом каспазы 8 и существует у мышей в двух формах cFLIP_L (long) и cFLIP_R (short). У человека существует третья форма белка cFLIP_S отличающаяся от короткой формы несколькими дополнительными аминокислотами в С-концевом домене. cFLIP считается критическим регулятором апоптоза и некроптоза, а его нокаут вызывает эмбриональную летальность у мышей на сроке 10,5 дней, что подтверждает его важность для развития организма. В случае изучения изолированных форм белка наблюдается их ингибирующая активность на каспазу 8, что свидетельствует о блокировании апоптоза. Однако, роль длинной формы гораздо обширнее, чем кажется на первый взгляд, так как белок может усиливать апоптотический сигналинг, если сравнивать его с короткой формой.

Не так давно (Ravi et al., 1998) было показано, что CD95 передает сигнал на выживание клетки через NF κ B, который, в свою очередь, ассоциирован с комплексом cFLIP, каспазы 8 и RIP1, через цитоплазматический хвост рецептора смерти. Но преобладающей функцией рецептора, при этом, является сигналинг к апоптозу. Несмотря на активное изучение как апоптоза, так и рецептора, пути регуляции процесса

так и не изучены досконально. Одной из причин этого является нехватка подходящих моделей для изучения влияния большого числа молекул, участвующих в апоптотическом сигналинге. Нарушения в сигналинге CD95 приводят к лимфопролиферативным заболеваниям, что видно на примере мышей линии Irg (Watanabe-Fukunaga, 1992), так как нарушен механизм негативной селекции Т-клеток. Однако изучение функционирования регуляторной каспазы 8 приводит к большим трудностям. При ее нокауте наблюдается эмбриональная летальность. Преодолеть ее можно только в совокупности с нокаутом RIP3, являющейся критическим регулятором некроптоза. Система, лишенная двух столь важных элементов, в принципе не может дать точную картину по функционированию остальных элементов в норме.

В случае с изучением cFLIP ситуация еще сложнее. Для преодоления эмбриональной летальности мышей с нокаутированным cFLIP, требуется нокаут FADD (FAS ассоциированный белок с доменом смерти от англ. Fas-associated protein with death domain) и RIP3 (Dillon et al., 2012). В результате такого тройного нокаута получают жизнеспособные мыши с признаками лимфопролиферативных заболеваний, что одновременно затрудняет исследование роли cFLIP на клеточную смерть.

Модель, позволяющая сравнить изоформы cFLIP, поможет понять, какую роль они играют в апоптозе, а также определить компоненты, дадут возможность влиять на их соотносительную экспрессию *in vivo*.

Как известно, cFLIP образует гетеродимеры с прокаспазой 8, что препятствует ее функционированию в роли активатора апоптоза, а значит cFLIP можно с уверенностью называть анти-апоптотическим белком (Shirley, Micheau, 2010). Влияние данного белка на некроптоз более вариабельно. Гетеродимер каспазы 8 и длинной формы блокирует расщепление RIP1 комплекса RIP1-RIP3, а в случае с короткой формой такого не происходит, что приводит к некроптозу. Таким образом, изменение соотношения длинной и короткой форм cFLIP способно регулировать апоптоз и, таким образом, определять судьбу клетки (Dillon et al., 2013).

В целом, суммируя вышеизложенное, можно утверждать о необходимости дальнейшего изучения критических клеточных процессов, таких как клеточная смерть и связанных с ними сигнальных путей, так как даже незначительные изменения в отдельных компонентах способны повлиять на итоговый результат. Сами же процессы являются основополагающими в развитии и выживании организма как комплексной

системы. Так, полиморфизмы генов *cFlar* и *Tmem173* определяют выживаемость клеток в различных условиях. Заполнение «белых пятен» в механизмах регуляции клеточной смерти даст возможность глубже понять биохимические механизмы ключевых клеточных процессов.

Однако существуют различные причины, затрудняющие их прямое изучение или делающие систему слишком отличающейся (тройной нокаут) от нормальной. Для решения этой проблемы необходимо наиболее целесообразное использование различных линий мутантных мышей, имеющих относительно небольшое количество одиночных нуклеотидных полиморфизмов, что позволит получить ранее недостижимые результаты. Следует отметить, что результаты, полученные при исследованиях на мышинных линиях, могут быть в определенной степени экстраполированы и на человека, не создавая этических сложностей. Это делает их более ценными, особенно в связи с мультидисциплинарностью информации.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Экспериментальные животные

Мыши линий C57BL/6, MSM и IFNAR^{-/-} были получены из лаборатории Jackson Laboratory (Бар Харбор, США). STING^{-/-} животные были получены от Глена Барбера (университет Майами, США). Мышей содержали в виварии Университета Тафтса (Бостон, США) и в виварии ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет» (Петрозаводск, Россия). Для изучения устойчивости к Jo2 (моноклональные антитела, агонисты FASR по авт. J.Ogasawara) *in vivo*, производились инъекции через хвостовую вену в количестве 10 мкг или 2,4 мкг MegaFasL (Multimetric Fas-Ligand, более активно присоединяющийся к Fas рецептору). Введение конструкта, имитирующего участок гена *Cflar*, также проводилось через хвостовую вену. Кострукт синтезировался с использованием набора Exontrap Kit (MoViTec, Germany) согласно инструкции производителя.

Все эксперименты с животными проводились с соблюдением Международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным (последняя редакция 2013 г.), принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского Сообщества (86/609 ЕЭС от 24 ноября 1986 г.), правил надлежащей лабораторной практики в Российской Федерации (GLP) (утв. Приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. №708н). Образцы клеток и тканей у исследуемых животных отбирали после усыпления в среде CO₂.

2.2 Выделение клеток из различных тканей и органов, их подсчет и активация

Для получения перитонеальных макрофагов использовали мышей в возрасте от 6-ти до 12-ти недель. Животным вводили 1 мл 3% тиогликолята интраперитонеально и собирали клетки промыванием перитонеальной полости 0,9% раствором хлорида натрия. Клетки осаждали центрифугированием в течение 3 мин при 1000 оборотах в минуту, ресуспендировали в ДМЕМ с 10% сывороткой телячьих эмбрионов, высевали, и стимулировали через 4 ч после засева в ДМЕМ, дополненной 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% Pen-Strep (Invitrogen, США), при 37 ° C в 5% CO₂.

Клетки костного мозга выделяли с помощью промывания бедренных костей холодной средой RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium). Клетки центрифугировали в течение 3 мин при 1000 оборотах в минуту. Клеточные осадки ресуспендировали в среде дифференцировки макрофагов костного мозга (RPMI среда с L-глутамином, 20% эмбриональной бычьей сыворотки, 28% L-cell conditioned medium, и 1% Pen-Strep) и культивировали в течение 7-8 дней при 37°C и 5% CO₂ в зрелые макрофаги (WeischenfeldtPorse, 2008).

CD3+, CD4+ и CD8+ Т-клетки, были выделены из селезенки, тимуса и периферических лимфатических узлов с использованием наборов EasySep (STEMCELL Technologies, Канада), согласно инструкциям производителям. Степень очистки составляла 97%. Активированные Т-клетки получали из выделенных и периферических лимфатических узлов добавлением активирующих CD3/CD28 Dynabeads (Thermo Fisher Scientific, США) в присутствии 50 ед/мл рекомбинантного IL-2. Культуральные чашки и планцеты с клетками содержались при 37°C и 5% CO₂.

Мышиные эмбриональные фибробласты выделялись с использованием Pierce Mouse Embryonic Fibroblast Isolation Kit (Invitrogen, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Активация макрофагов в эксперименте проводилась добавлением DMXAA (SigmaAldrich, США) от 2,5 до 10 мкг/мл в течение 4, 12 или 24 часов. Для активации ТКР добавляли 3 мкг/мл анти-CD3 и анти-CD28 (Abcam, Великобритания) на 12 часов. Ингибиторы программируемой клеточной смерти Z-VAD (OMe)-FMK (Bachem,

Швейцария) и Necrostatin1 (Sigma Aldrich, США) добавлялись в среду до концентраций 50 мкМ и 30 мкМ, соответственно.

T-клетки для эксперимента стимулировались добавлением DMXAA от 2,5 до 10 мкг/мл в течение 4, 12 или 24 часов. Для активации ТКР добавляли 3 мкг/мл анти-CD3 и анти-CD28 на 12 часов. R'S'sGAMP (Invivogen, США), в случае его использования, добавлялся в среду инкубирования клеток до концентрации 4 мкг/мл. Ингибиторы программируемой клеточной смерти Z-VAD (OMe)-FMK (Wachem, Швейцария) и Necrostatin1 (Sigma Aldrich, США) добавлялись в среду до концентраций 50 мкМ и 30 мкМ, соответственно

Для определения пролиферации T-клеток к ним добавляли CFSE (сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина от англ. Carboxyfluorescein succinimidyl ester) до концентрации 5 мкМ и измеряли его содержание относительно контроля на проточном цитометре MACSquantalyzer 10 (MiltenyiBiotec, Германия) спустя три дня. Для определения дифференцировки клеток к ним добавляли соответствующие антитела (eBioscience, США), согласно инструкциям производителя, и определяли количество связавшихся с антителами клеток на проточном цитометре MACSquantalyzer 10 (MiltenyiBiotec, Германия).

Для определения выживаемости клеток использовали раствор йодистого пропидия конечной концентрацией 10 мкг/мл (Life Technologies, США), который проникает лишь в мертвые клетки. Подсчет производили в 96-луночной планшете на приборе TECAN Infinite 200 Pro (TECAN, Швейцария). В качестве контроля 100% элиминации использовали среду с 0.1% Triton X-100 (Promega, США) (Case et al., 2013)

2.3 Микроскопические методы

Электронные микрофотографии делали на базе главного медицинского центра Тафтс (Бостон, США) с использованием системы Leica SP8 (Германия).

2.4 Выделение РНК и обратная транскрипция

Выделение тотальной клеточной РНК проводили стандартным методом кислой фенольной экстракции с помощью набора «РНК-Экстран» («Синтол», Москва) согласно инструкции производителя. Высушенный осадок РНК растворяли в 50 мкл деионизованной ddH₂O, не содержащей РНКаз. Качество и концентрацию полученной РНК определяли по соотношению 18S и 28S пиков методом капиллярного электрофореза на автоматической станции Fragment Analyzer (Advanced Analytical, США).

Для удаления возможной примеси геномной ДНК образцы РНК предварительно обрабатывали ДНК-азой I («Fermentas», Литва) в соответствии с протоколом, рекомендуемым производителем. Реакцию обратной транскрипции проводили в двукратном объеме с использованием набора реактивов фирмы «Синтол» (Москва). В реакцию брали 1 мкг образца РНК на один объем; количества остальных компонентов реакционной смеси соответствовали инструкции производителя. В качестве праймеров для обратной транскрипции использовали смесь случайных гексануклеотидов («Силекс», Москва). Реакцию проводили при температуре 37°C в течение 1 часа с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 70°C в течение 10 минут.

2.5 Секвенирование транскриптома

Для последующего секвенирования образцы тотальной РНК подготавливали с помощью наборов TruSeq Stranded RNA LT Kit (Illumina, США), согласно инструкции предлагаемой фирмой производителем. Для реакции обратной транскрипции использовали обратную транскриптазу SuperScript (Invitrogen, США). Для позитивной или негативно селекции компонентов использовали различные модификации магнитных шариков (BeckmanCoulter, США), рекомендованных производителем наборов. Длину фрагментов и содержание кДНК в библиотеках на выходе проверяли с помощью автоматической станции Fragment Analyzer (Advanced Analytical, США).

Секвенирование библиотек проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) по рекомендациям производителя. Для денатурации использовали 2н раствор гидроксида

натрия. Сиквенс производился с использованием реагентов с длиной прочтения 2*75 нуклеотидов. Данные, обладающие качеством ниже Q30, отсеивались на этапе обработки прибором. Полученные результаты обрабатывались с помощью программного обеспечения TopHat2 (Trapnell et al., 2010; Trapnell, Pachter, Salzberg, 2009). Данные секвенирования находятся в свободном доступе в базе данных GEOOmnibus под номерами GSE89361 и GSE72454.

2.6 Полимеразная цепная реакция

Реакцию амплификации в режиме «реального времени» проводили в объеме 25 мкл с помощью прибора «StepOnePlus» (AppliedBiosystems, США) и интегрированного программного обеспечения версии 2.2.2, используя наборы реагентов для проведения ПЦР в режиме «реального времени» в присутствии интеркалирующего красителя *SYBRGreen* («Синтол», Москва). Синтез олигонуклеотидов был осуществлен компанией «New England Biolabs» (США). При приготовлении реакционной смеси для ПЦР придерживались объемов компонентов, рекомендуемых фирмой-производителем. Температуру отжига праймеров использовали в соответствии с рекомендациями производителя. Амплификацию проводили по следующему протоколу: плато – 95°C в течение 5 мин; цикл: 40 повторов – 25 с при 95°C, 25 с при оптимальной температуре отжига праймера, 25с при 72°C. Детекция интенсивности флуоресцентного сигнала осуществлялась на этапе отжига/элонгации. ПЦР-реакции для каждого образца и каждого гена проводили в трех независимых повторностях. Все результаты нормализовывались относительно значений экспрессии гена GAPDH. В качестве праймеров использовались следующие последовательности:

GAPDH (F) GGAGAGTGTTCCTCGTCCC (R)TTCCCATTCTCGGCCTTGAC;
 IFIT1 (F) CAGAAGCACACATTGAAGAA (R)TGTAAGTAGCCAGAGGAAGG; IFIT2 (F)
 GGGAAAGCAGAGGAAATCAA (R)TGAAAGTTGCCATACAGAAG; MX2 (F)
 AGTGAGGAGCTGCAGAAGTACG (R)ACTTGGTAGTTCTGTGGAGGTT; XBP1u (F)
 AAGAACACGCTTGGGAATGG (R)ACTCCCCTTGGCCTCCAC; XBP1s (F)
 GAGTCCGCAGCAGGT G (R) GTGTCAGAGTCCATGGGA; BCL-2 (F)
 TTATAAGCTGTACAGAGGGGCTAC (R) GAACTCAAAGAAGGCCACAATCCTC

2.7 Качественный и количественный анализ белков и пептидов

Иммуноблоттинг проводился на градиентном полиакриламидном геле по Леммли (1970). Затем образы переносились на нитроцеллюлозную мембрану и связывались с первичными антителами, после чего с ними связывались вторичные, флуоресцирующие антитела (Cell Signaling, США). Флуоресценцию определяли на приборе SpectraMaxI3 (MolecularDevices, США).

Содержание цитокинов в супернатанте определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа DuoSet ELISA (R&D Systems, США) и согласно инструкциям производителя с использованием антител от производителя Cell Signaling (США). Флуоресценцию определяли на приборе SpectraMaxI3 (MolecularDevices, США).

2.8 Определение активности аланинаминотрансферазы

Определение активности аланинаминотрансферазы проводили по методу Райтмана-Френкеля с использованием набора реактивов Трансаминаза-АЛТ-Ново (Вектор-бест, Москва) согласно рекомендациям производителя.

2.9 Трансфекция

Для пересадки клеток, были выделены CD3⁺ Т-клетки из мышей линии C57BL/6. Эти клетки экспрессируют CD45.1. После культивации *in vitro* около 8 миллионов клеток было введено STING^{-/-} мышам, чьи клетки экспрессируют CD45.2. Через 12 часов после инъекции DMXAA в хвостовую вену, CD3⁺ Т-клетки вновь были выделены и разделены на CD45.1 и CD45.2 методом FACS (Fluorescence activated cell sorting – сортировка клеток с применением активируемой флуоресценции,) на FACS Aria (BD Biosciences, США) с использованием реактивов и стандартных процедур, рекомендуемых производителем, для последующего выделения РНК.

2.10 Статистическая обработка результатов исследования

Полученные данные обрабатывали с использованием пакетов статистических программ MS Excel и Statgraphics общепринятыми методами вариационной статистики, программой статистической обработки и графического дизайна PRISM 7 (GraphPadSoftware). Сравнение проводили, используя непараметрический критерий (U) Вилкоксона-Манна-Уитни, кластерный анализ (метод ближайшего соседа), метод логарифмических рангов и метод количественно связанных локусов. Для оценки степени влияния факторов использовали дисперсионный анализ (Коросов, Горбач, 2010). Для оценки вовлечения сигнальных путей в ответ клеток на различные стимулы использовали программное обеспечение баз данных PANTHER и Qiagen SABiosciences. Количественную оценку вовлечения сигнальных путей проводили с использованием метода Oncofinder (Buzdin et al., 2014).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Влияние активации CD95 на мышей линий C57BL/6 и MSM различными агонистами

Для изучения влияния Jo2 на мышей, животным интраперитонеально вводили 10 мкг данного вещества. Мыши MSM, по сравнению с C57BL/6 продемонстрировали высокую устойчивость к летальным дозам вещества при интраперитонеальном введении. Гибель гибридов первого поколения наступала в среднем через 8,5 часов после инъекции, а максимальное время выживания составило 21,5 часов в отличие от мышей C57BL/6 показавших значения 6,9 и 16 часов соответственно (Рис. 1).

Гистологический анализ печени показал, что у C57BL/6, в отличие от MSM, после введения Jo2 наблюдалась фрагментация ядра и разбухание митохондрий (Рис. 2). Также, немаловажно, что печень MSM и гибридов первого поколения не имеет существенных отличий, а у C57BL/6 орган сильно увеличен, таким образом изменения наблюдаются как на макро-, так и на микроскопическом уровне (Рис. 3).

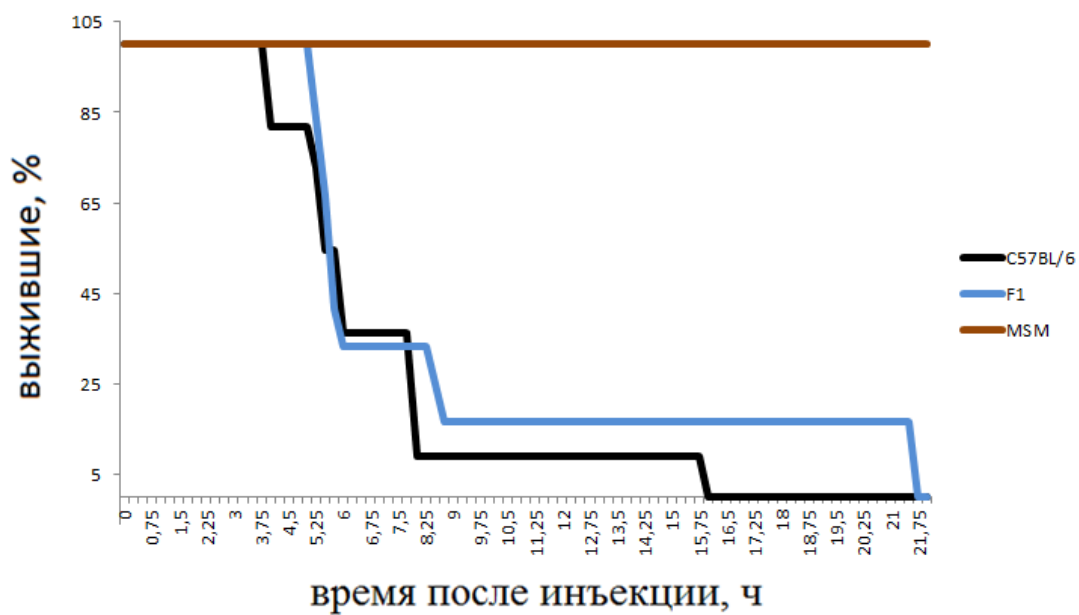


Рис. 1. Динамика смертности мышей линий C57BL/6, MSM и их гибридов F1 после интраперитонеального введения 10мкг Jo2.

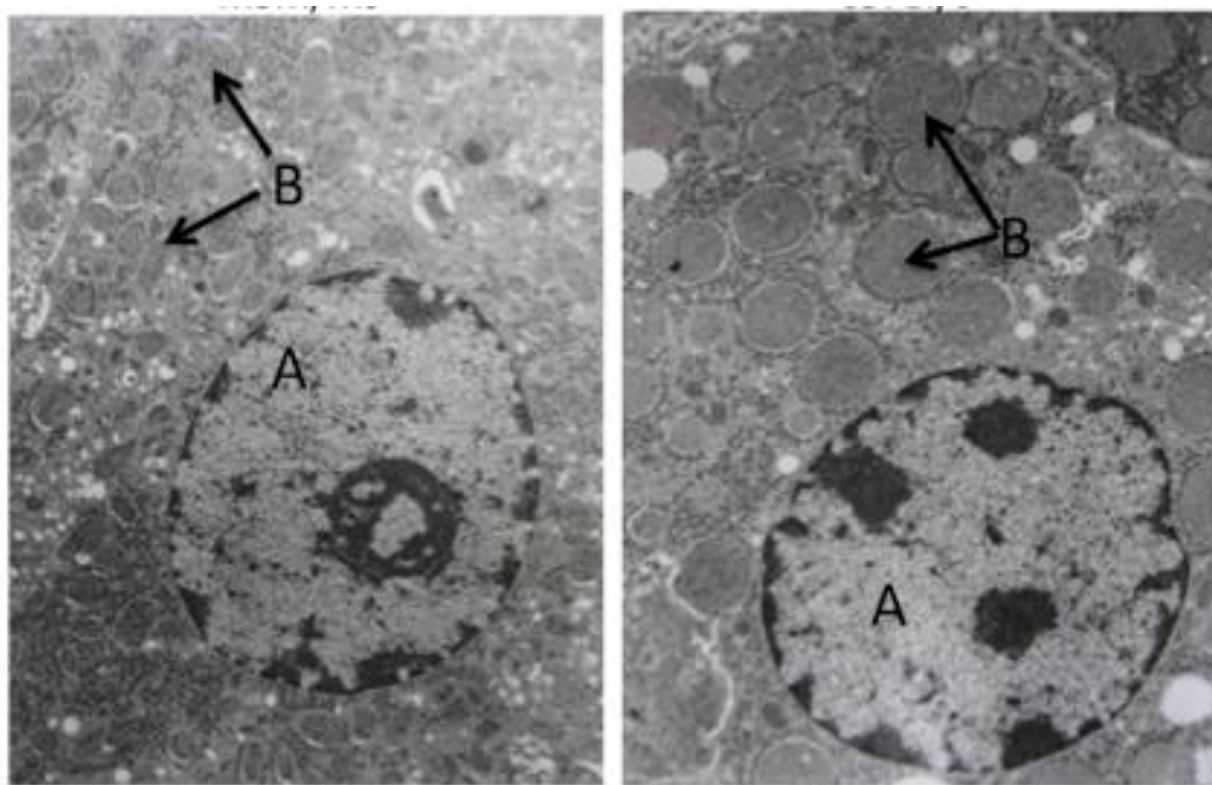


Рис. 2. Электронная микрофотография гепатоцитов мышей линий MSM (справа) и C57BL/6 (слева) после инъекции 10мкг Jo2.

Условные обозначения: А- ядро, В – митохондрии.

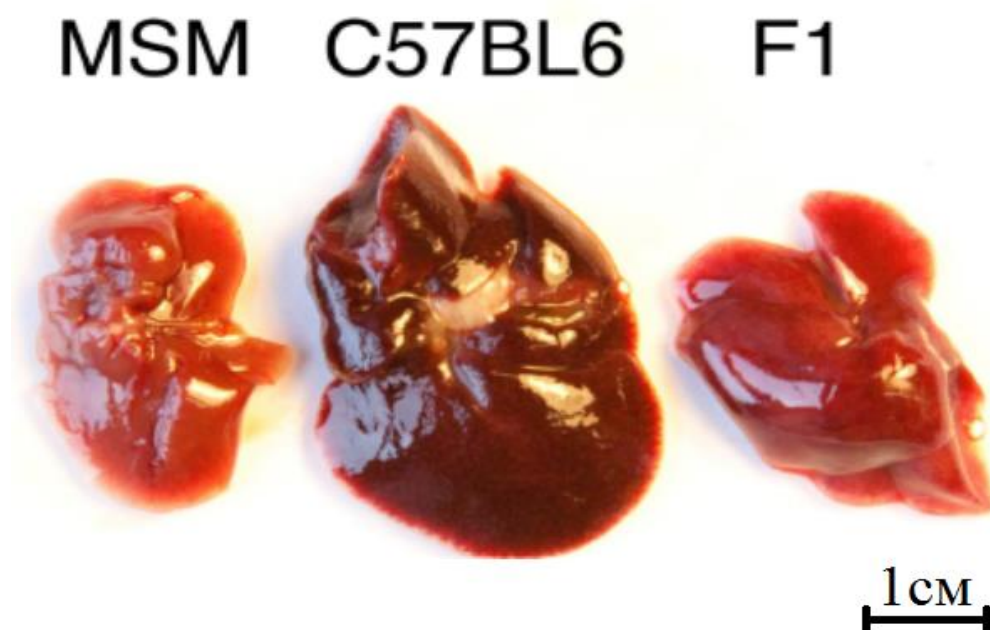


Рис. 3. Внешний вид печени мышей линий MSM, C57BL/6 и их гибридов через 4,5 часа после интраперитонеальной инъекции Jo2.

Уровень АЛТ (аланинаминотрансфераза), маркера повреждения печени (Tunon et al., 2009), у C57BL/6 многократно возрастал через 4 часа после введения Jo2, с 37,07 МЕ/л до 236,08 МЕ/л, в то время как у мышей MSM наблюдалось только его двукратное повышение - с 30,76 МЕ/л до 61,56 МЕ/л (Рис. 4). В совокупности с литературными, эти данные позволили предположить, о наличие у животных поражения печени.

Для подтверждения наличия апоптоза, как механизма клеточной смерти в гепатоцитах, были взяты лизированные пробы данного органа на наличие активной формы каспазы 3, важного эффекторного компонента апоптоза. Забор проб производился через 4,5 и 6 часов после инъекции. Активации фермента у мышей линии MSM не наблюдалось. У линии мышей C57BL/6 обнаружена активная форма уже через 4,5 часа, а гибриды показали более позднюю активацию, у них активная форма фермента обнаружена лишь через 6 часов (Рис. 5).

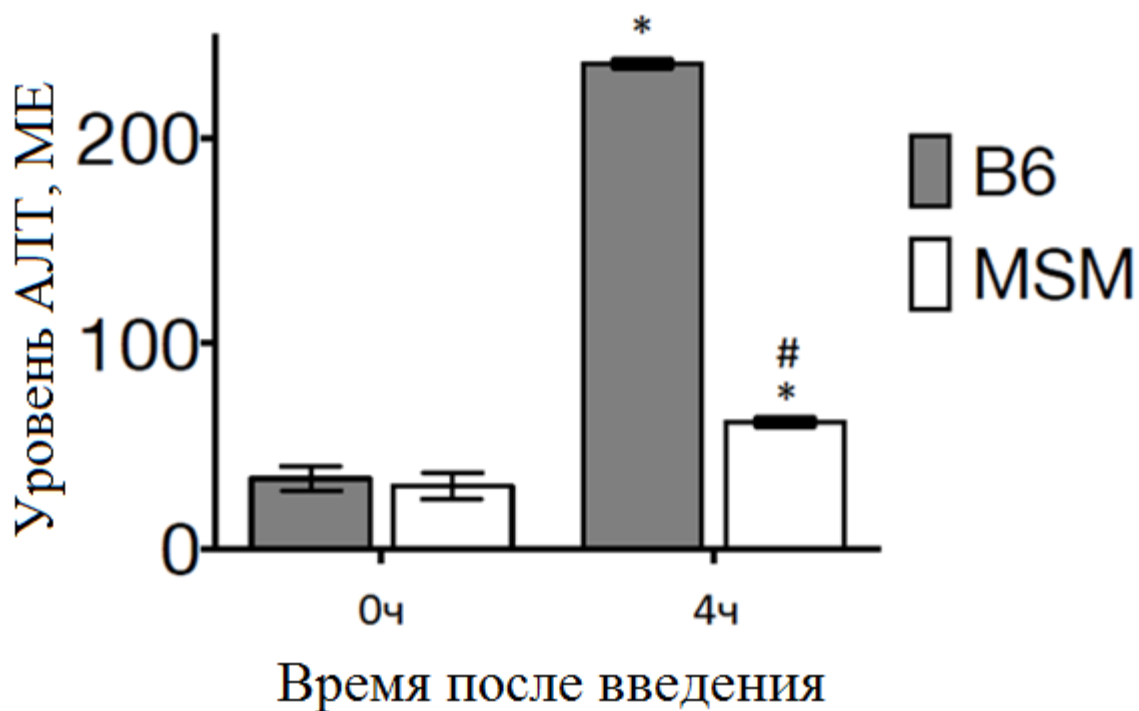


Рис. 4. Изменение уровня аланинаминотрансферазы после интраперитонеального введения 10мкг Jo2 у мышей линий C57BL/6 и MSM ($M \pm m$).

Условные обозначения: * - отличие от образцов взятых непосредственно после инъекции достоверно; # - отличие от образцов взятых у мышей линии C57BL/6 достоверно.

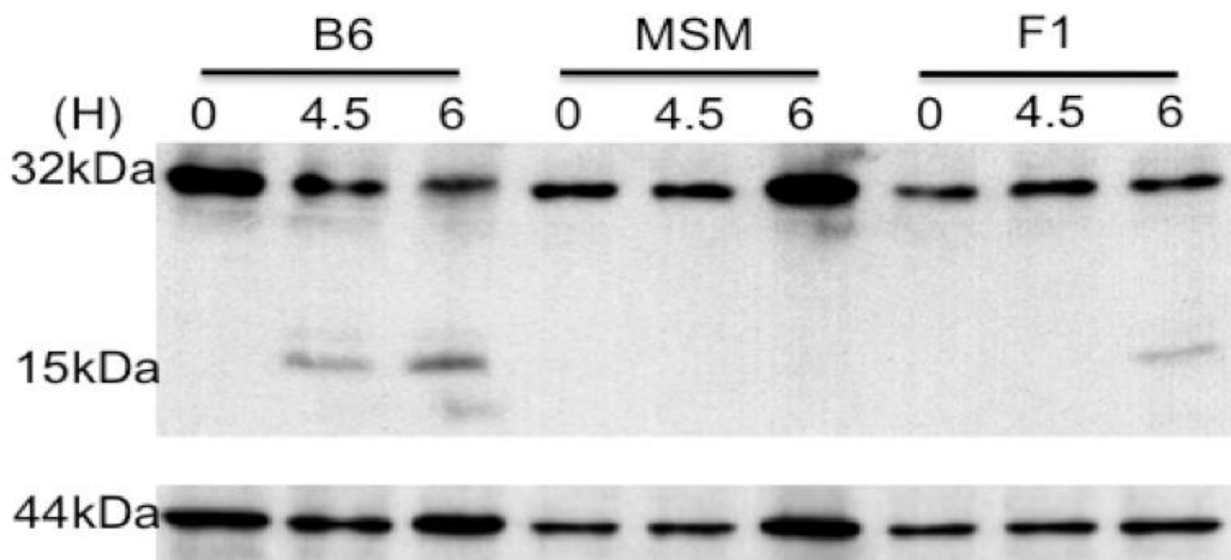


Рис. 5. Вестерн-блот активации каспазы 3 в печени при стимуляции Jo2 мышей линий C57BL/6, MSM и их гибридов в зависимости от времени после стимуляции. В качестве маркера контроля использовалась глутатион S-трансфераза (44кДа).

Секвенирование и анализ экзона и транскриптома мышей показали множественные полиморфизмы у линии MSM в генах, кодирующих компоненты пути CD95, в частности CASP8 (каспаза 8 от англ. Caspase-8), FADD, RIP1 и, собственно, CD95. Для того, чтобы исключить дефекты в сигналинге, связанные с одной из этих мутаций, мы сравнили реакцию *in vivo* мышей линий C57BL/6 и MSM на Jo2 клетками печени (гепатоциты являются клетками 2го типа) с ответом тимоцитов *in vitro* (Krammer, Arnold, Lavrik, 2007). Для более активного связывания, которое наблюдается при введении антител *in vivo*, был добавлен G-белок, содействующий связыванию моноклональных Jo2 антител (Nishimura et al., 1997). В отличие от влияния на клетки печени, Jo2 оказывал существенный цитотоксический эффект на тимоциты как MSM, так и C57BL/6 (Рис. 6). Добавление в базовую инкубационную среду Jo2 и G-белка приводило к гибели 75% тимоцитов C57BL/6 и 66% данных клеток MSM. При добавлении к такой смеси zVAD (N-бензилоксикарбонил-Val-Ala-Asp(O-Me) флюорометил кетон, ингибитор апоптоза) количество клеток даже увеличивалось - значения составили 111 и 102%, а при инкубации клеток в базовой среде с добавлением протеина G - 100 и 104%, соответственно. Для исключения влияния G-белка на полученный результат, тимоциты были протестированы с помощью mFasL (многомерный Fas-лиганд от англ. Multimeric Fas-Ligand) (Jodo et al., 2000). Полученный результат оказался аналогичным тому, что наблюдалось с Jo2 (Рис. 7). Так значения выживаемости при добавлении mFasL составили 16 и 27% для мышей C57BL/6 и MSM, а при добавлении mFasL и zVAD 83 и 86% соответственно. Дополнительно были проверены на восприимчивость к CD95-обусловленной смерти и перитонеальные макрофаги с мышинными эмбриональными фибробластами. В обоих случаях была установлена восприимчивость к mFasL (Рис. 8, 9). Так, выживаемость макрофагов при добавлении mFasL составила 35 и 75%, а при добавлении mFasL и zVAD 108 и 83% для линий C57BL/6 и MSM соответственно. Эти же показатели для мышинных эмбриональных фибробластов составили 78 и 64% для линий C57BL/6 и MSM, а добавление mFasL и zVAD изменило их на 86 и 90% для этих же линий.

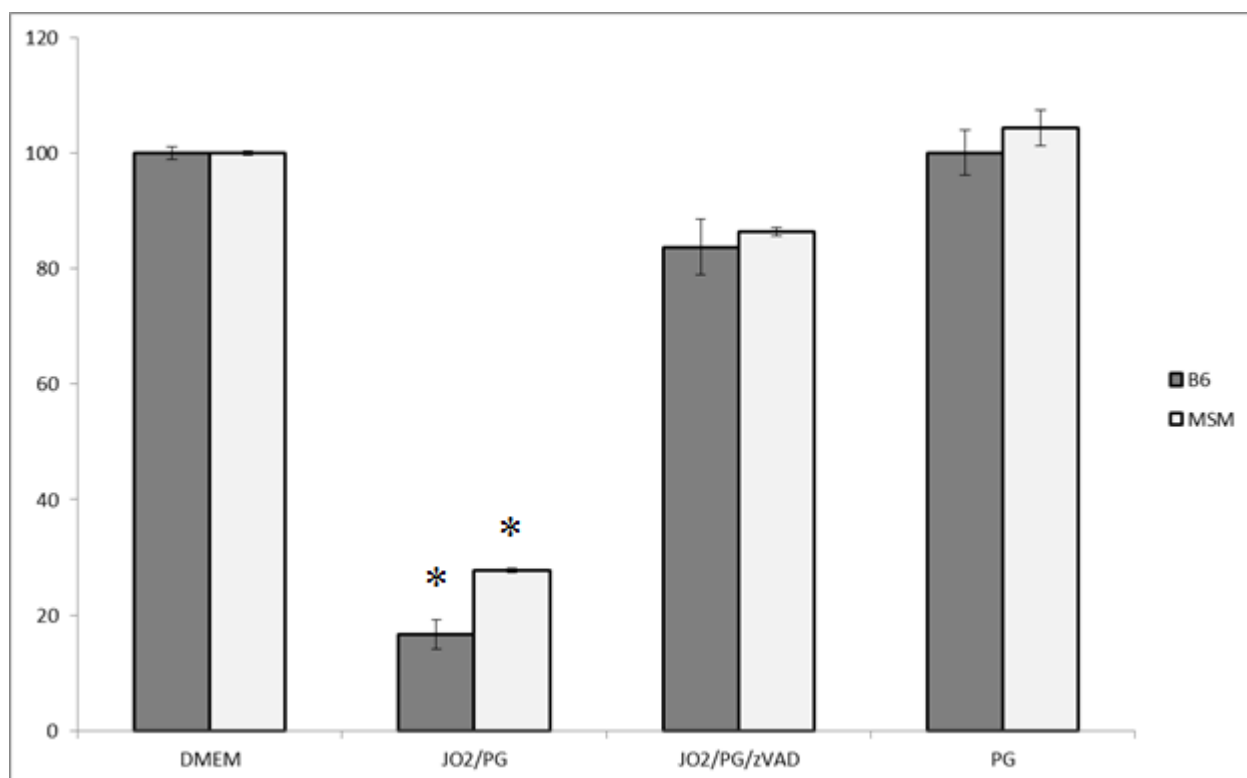


Рис. 6. Доля выживших тимоцитов (в % по отношению к контролю) мышей линий C57BL/6 и MSM после 8ми часовой активации Jo2, протеином G (PG) и zVAD. Условные обозначения: * - отличие от образцов, находившихся в средах с другими составами, достоверно.

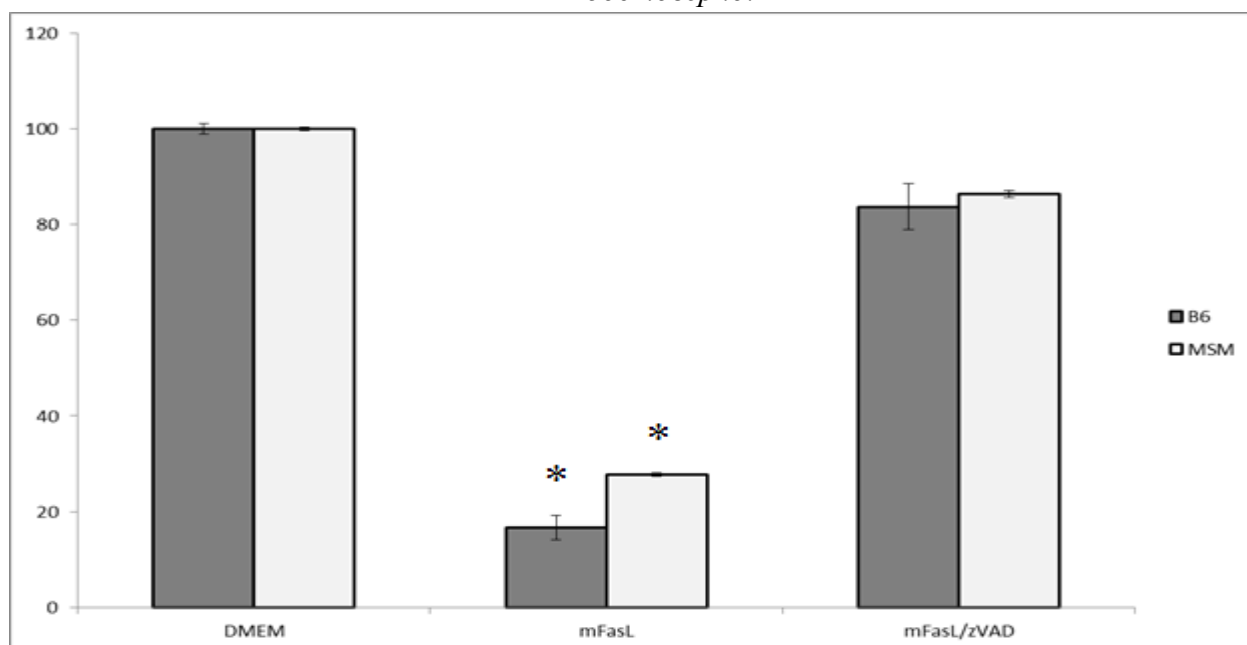


Рис. 7. Количество выживших по отношению к контролю тимоцитов мышей линий C57BL/6 и MSM после 8ми часовой активации megaFasL и zVAD. Условные обозначения: * - отличие от образцов, находившихся в средах с другими составами, достоверно.

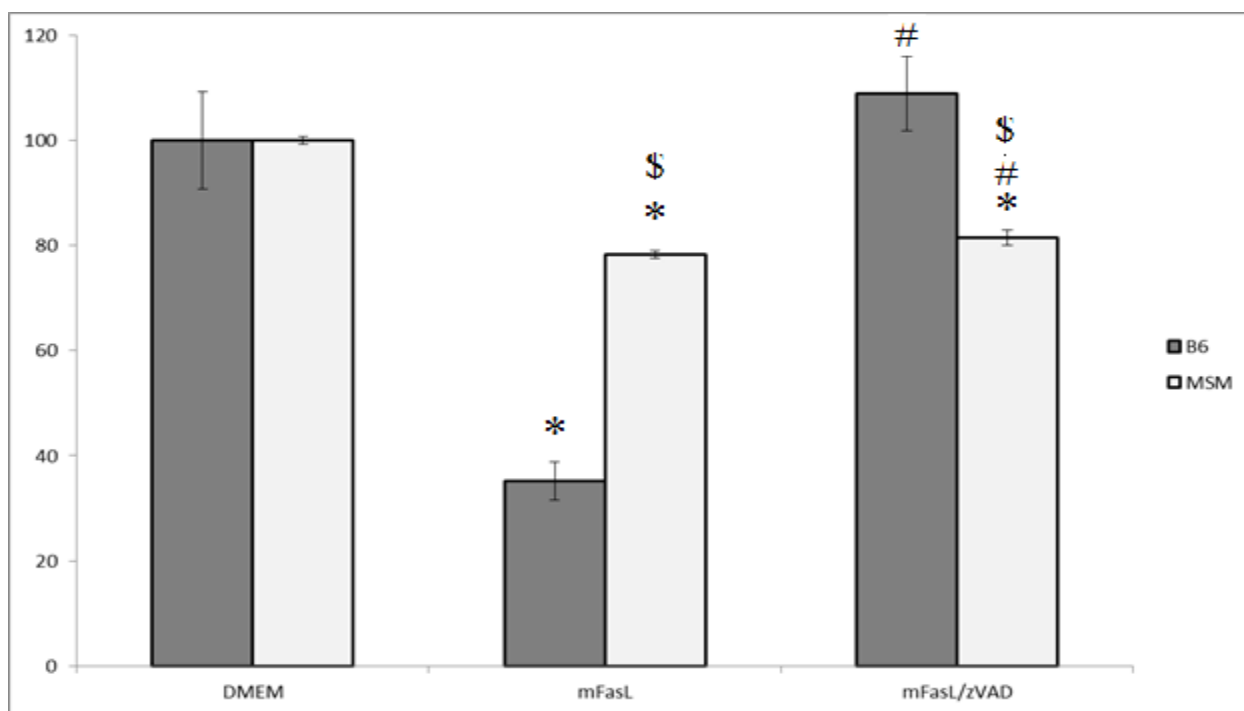


Рис. 8. Количество выживших по отношению к контролю перитонеальных макрофагов мышей линий C57BL/6 и MSM после 8ми часовой активации *megaFasL* и *zVAD*.

Условные обозначения: * - отличие от образцов, находившихся в среде без добавок, достоверно.

- отличие от образцов, находящихся в среде с *mFasL*, достоверно.

\$ - отличие от образцов C57BL/6, находящихся в такой же среде, достоверно.

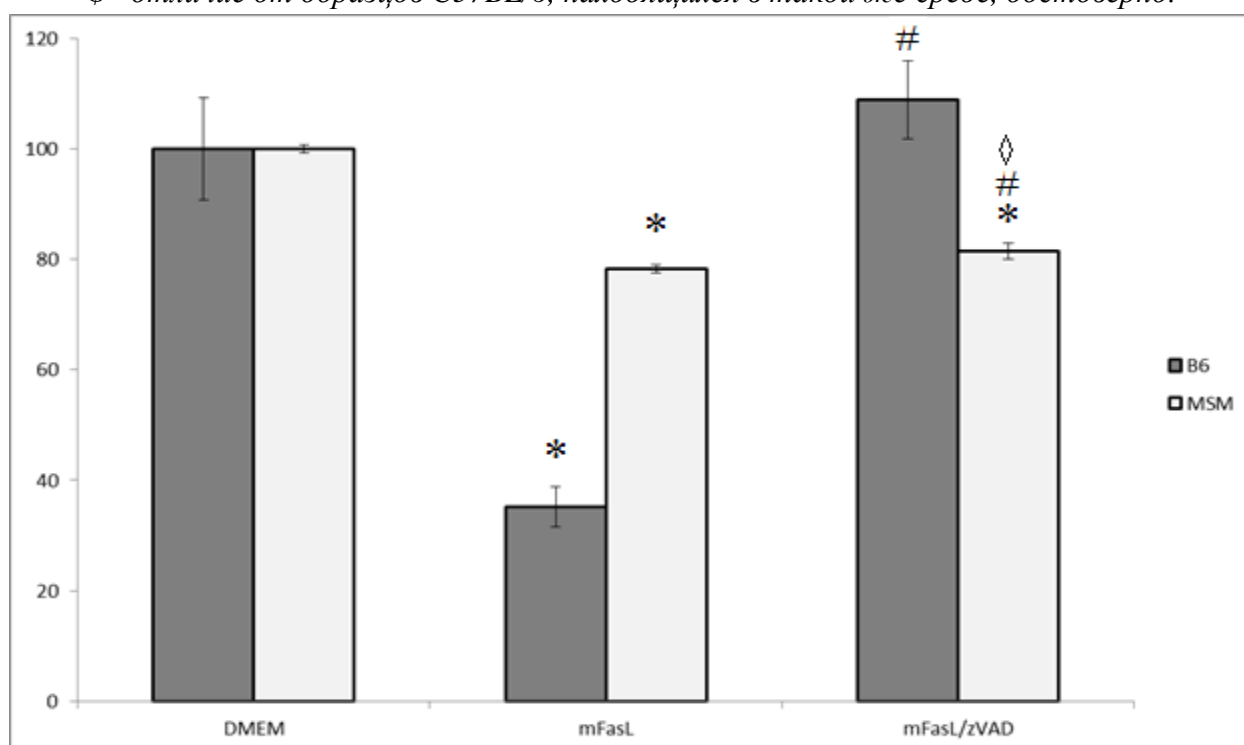


Рис. 9. Количество выживших по отношению к контролю эмбриональных фибробластов мышей линий C57BL/6 и MSM после 8ми часовой активации *megaFasL* и *zVAD*.

Условные обозначения: * - отличие от образцов, находившихся в средах с другими составами, достоверно.

При изучении устойчивости мышей к MegaFasL, животные линии MSM как и C57BL/6 оказались чувствительны к веществу. Так, все мыши линии C57BL/6 умерли через 9,25 часов, при этом средний показатель составил 4,46 часа. Мыши линии MSM имели среднее значение 3,79 часа, однако, погибло лишь 6 из 8 особей (Рис. 10). Эти данные коррелируют с данными по уровням аланинтрансферазы (Рис. 11). Так, средние значения для мышей MSM и C57BL/6 при инъекции составили 9073 МЕ/л и 5874 МЕ/л, что достоверно отличается от контрольной группы мышей, где показатели были соответственно 72 МЕ/л и 79МЕ/л.



Рис. 10. Динамика смертности мышей линий C57BL/6 и MSM при интраперитонеальном введении 1,5 мкг MegaFasL.

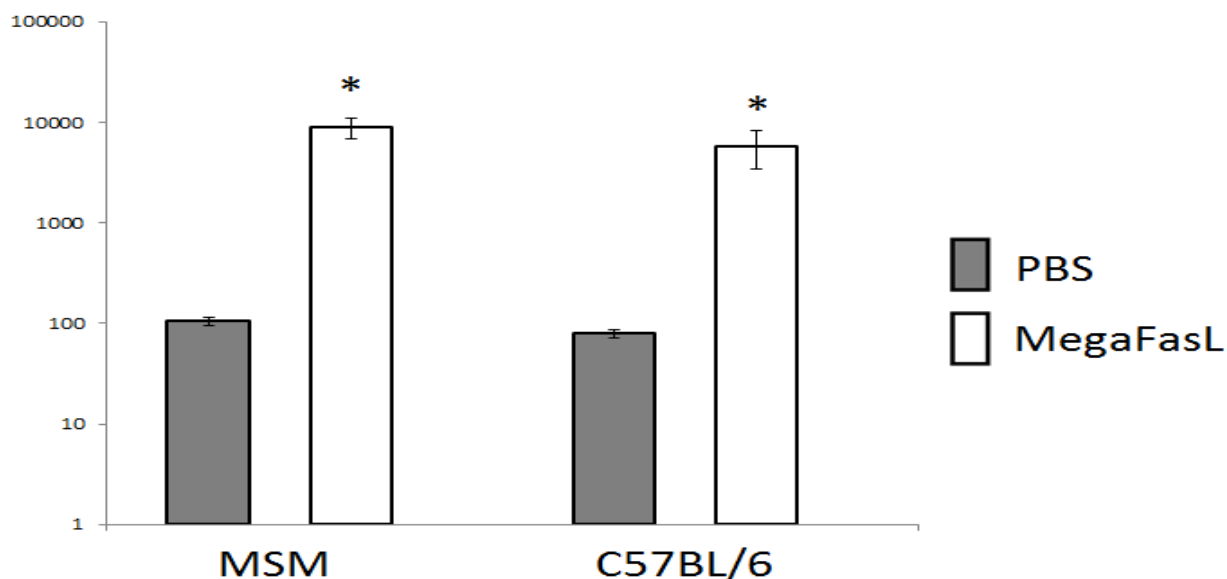


Рис. 11. Уровень аланинаминотрансферазы в печени мышей линий C57BL/6 и MSM при интраперитонеальном введении 1,2мкг MegaFasL или чистого PBS через 2 часа. Условные обозначения: * - отличие от образцов, взятых у мышей с введенным PBS, достоверно

Для дальнейшей характеристики апоптотического каскада гепатоцитов мышей, активированного инъекцией MegaFasL, были изучены фрагменты каспаз 3 и 9 после протеолиза (Рис. 12). Так, было обнаружено снижение их проформ и увеличение содержание активной субъединицы каспазы 3 (p17) при введении изучаемого лиганда. Кроме того было обнаружено снижение уровня RIP1, что позволяет говорить о блокировании некроптотического пути.

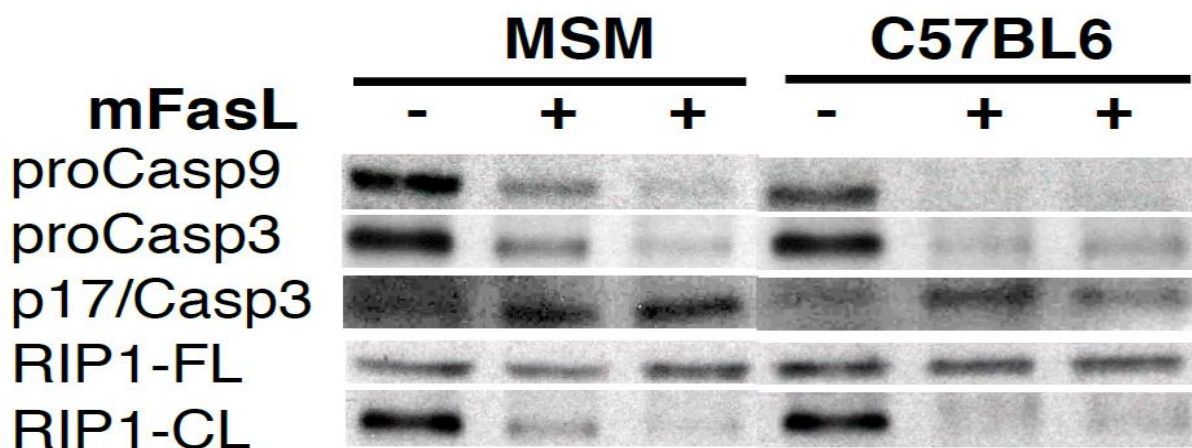


Рис. 12. Вестерн-блот лизатов печени мышей линий C57BL/6, MSM при 2х часовой стимуляции MegaFasL. Исследованы проапоптотические белки proCasp3, proCasp9 и RIP1.

Условные обозначения: «+» - стимуляция присутствовала, «-» - стимуляция отсутствовала.

Для изучения устойчивого фенотипа на молекулярном уровне был проведен полногеномный анализ уровней мРНК в печени и тимусе при воздействии MegaFasL. В первую очередь сравнивались уровни экспрессии генетических маркеров повреждения печени (Jeong et al., 2003), такие как группа генов *Saa*, гистоны и некоторые цитокины (Рис. 13). Согласно получившейся тепловой карте и построенной с помощью программного обеспечения GenePattern кладограмме, образцы разделились на 2 группы экспрессии: по типу печени и по типу тимуса. Уровни экспрессии внутри каждой из групп не имели, в целом, экстремальных различий, однако они были между группами.

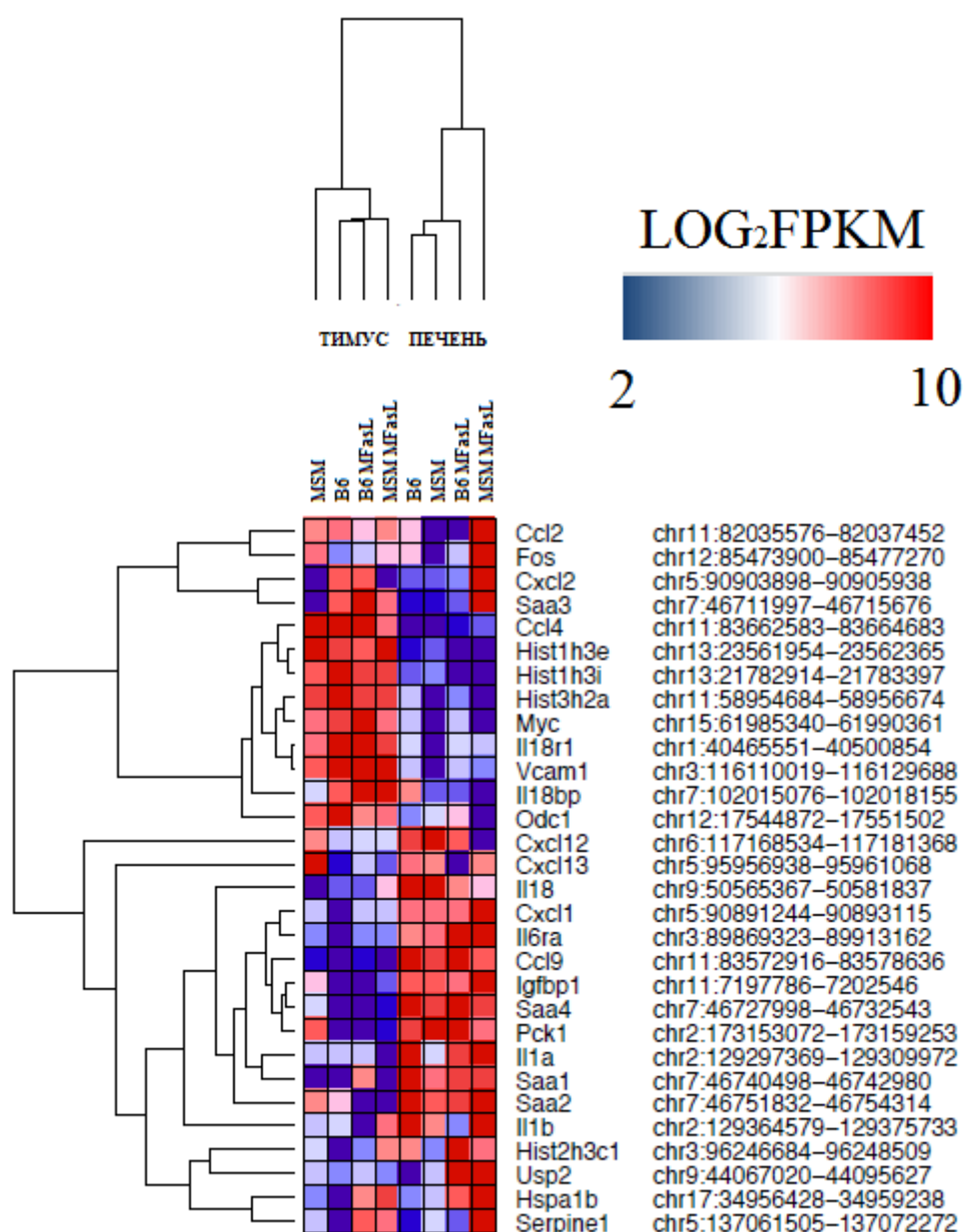


Рис. 13. Кладограмма и тепловая карта, показывающие разницу генетического профиля тимуса и печени мышей линий MSM и C57BL/6 до и после введения MegaFasL. Данные получены с использованием программного обеспечения GenePattern.

3.2 Влияние полиморфизма локуса *cFlar* на кодируемый им белок

Как описано выше, устойчивость мышей MSM к индуцированной Jo2 гибели передается гибридам первого поколения, а значит, является признаком, который можно изучать методами классической генетики. Исходя из этого, были получены путем интеркроса мыши F2, которым был введен Jo2 в дозе летальной для мышей линии C57BL/6. Далее, с использованием программного обеспечения анализа QTL (Manichaikul et al., 2009), было изучено сцепление выживания животных с позициями генома F2. После проведения двумерного анализа, проверяющего локусы на совокупное наследование, были определены потенциально сцепленные участки, которые находились на хромосомах 1 и 7. Участок на хромосоме 1 располагался проксимально к генам *Casp8* и *cFlip*. Однако секвенирование показало отсутствие различий между участками *Casp8* мышей MSM и C57BL/6. Во втором гене-кандидате, у мышей линии MSM была обнаружена вставка размером в 21 п.н. после пятого экзона (Рис. 14).

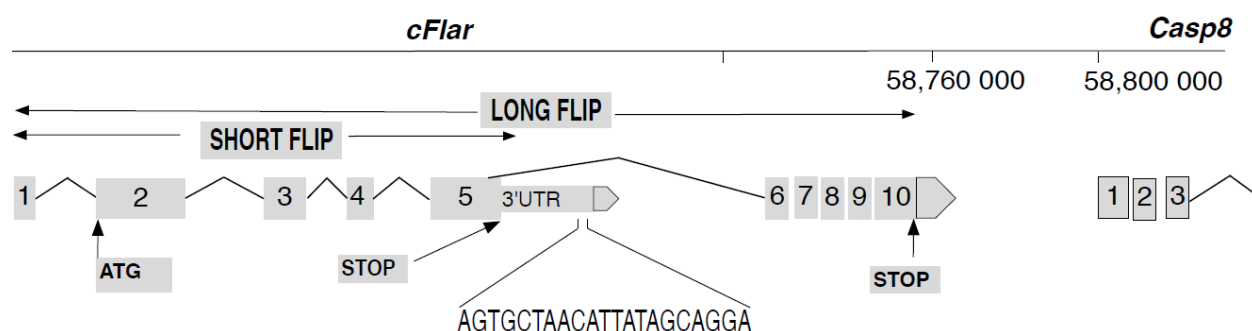


Рис. 14. Генетическая карта *cFlar*. Указана инсерция в 21 п.н.

Данные, полученные благодаря методам высокопроизводительного секвенирования РНК (NGS – next generation sequencing), позволяют сравнивать базовый уровень (при отсутствии стимуляции) соотношения длинной и короткой форм *cFLIP* в печени и тимусе мышей линий MSM и C57BL/6. Прежде всего, используя диаграммы Сашими и показатели генетической экспрессии в формате *.bam (Wu, Nance, Montgomery 2014), были визуализированы данные генетической экспрессии и, в частности, варианты сплайсинга длинной и короткой изоформ. На рисунке 15 показаны результаты визуализации экзонов 4-8 гена *cFlar* с использованием программного обеспечения IGV. Для этого учитывались только те прочтения, которые захватывают 2 или более экзонов. К примеру, для печени C57BL/6 имеется 10 прочтений,

соединяющих 4 и 5 экзоны, и всего 6, соединяющих 5 и 6-й, что соответствует длинной форме cFLIP. В случае с мышами MSM на 16 ридов, соединяющих 4 и 5 экзоны, приходится 16 соединяющих 5 и 6, что свидетельствует о преимущественном сплайсинге длинной формы cFLIP.

Для дальнейшего изучения проблемы сравнивали относительные значения количества частичных прочтений нормализованных относительно общего количества прочтений (FPKM). Так, в тимусе этот показатель составил 2,5 для C57BL/6 и 2,25 для MSM, а в печени 1,16 и 0,375, соответственно. Эти данные представлены на рисунке 16. Они показывают различие между соотношением изоформ белка в печени мышей линий C57BL/6 и MSM. В тимусе достоверных различий не обнаружено.

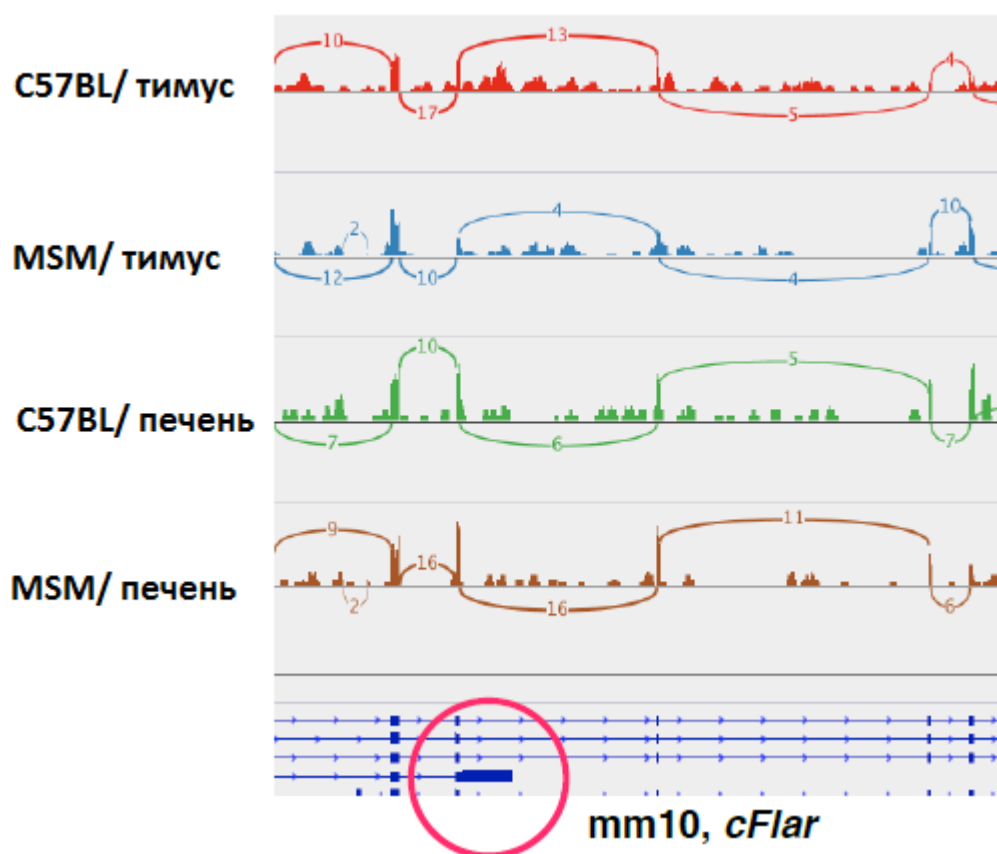


Рис.15. Карта транскриптома окрестностей 5-го локуса гена cFlar. Цифрами указано количество прочтений, захватывающих минимум 2 экзона. На графике указана специфичность по линии (MSM и C57BL/6) и ткани (печень и тимус).

Условные обозначения: красным кружком выделен экзон 5 на референсной схеме.

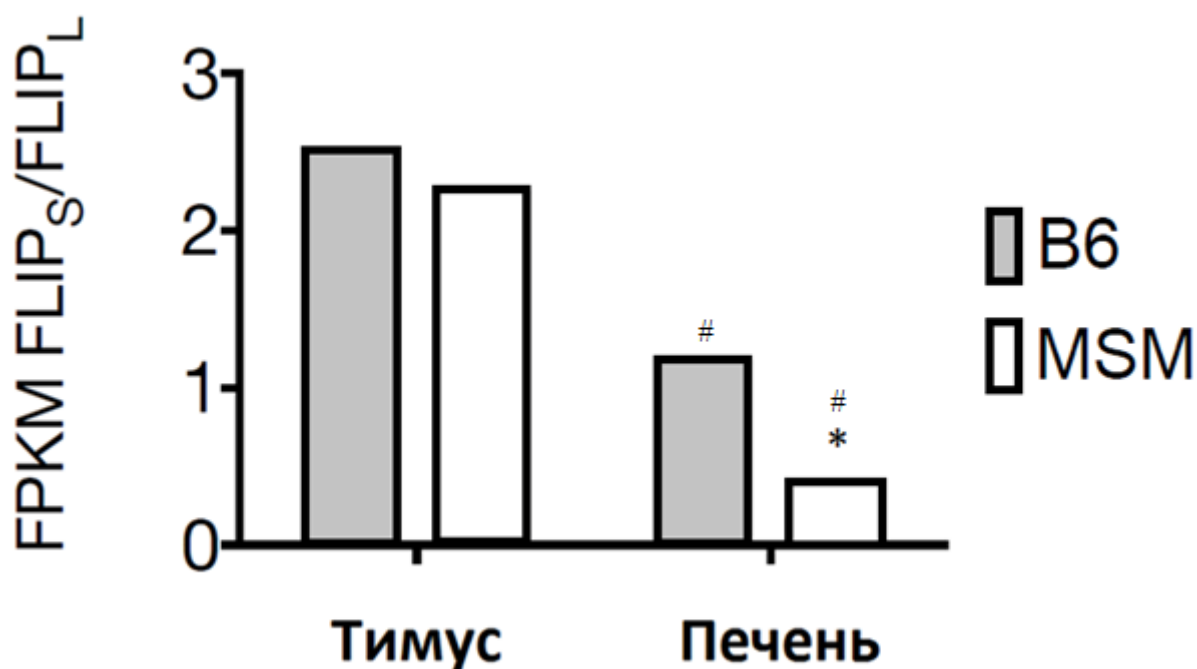


Рис.

16. Соотношение длинной и короткой форм *cFlip* линий мышей C57BL/6 и MSM в печени и тимусе. Образцы взяты у животных без стимуляции. FPKM – число фрагментов на 1000 оснований в референсном геноме на миллион отсеквенированных п.н. Условные обозначения: * - различия с линией C57BL/6 достоверны, # - различия с образцами тимуса достоверны.

Для того, чтобы доказать достоверность связи между данной вставкой из 21 п.н. и особенностями сплайсинга, 5-й экзон мышинового *cFlar*, а также фланговые интронные последовательности были клонированы экзон-захватывающим вектором pET01. Данный вектор всегда содержит 2 дополнительных экзона, это донорный и акцепторный с 5'-донорным и 3'-акцепторным участками (Rogaev et al., 2009) (схема конструктора приведена на рисунке 17). Далее, проведя инъекцию данного конструктора в хвостовую вену, была изучена экспрессия данного конструктора в печени C57BL/6. Используя комплементы экзонов F1, R1 и R2 сравнивали эффективность сплайсинга по типу C57BL/6 и MSM. qPCR короткой формы показал более высокую активность в конструкторе по типу C57BL/6 (в 13,5 раза), а вот длинная форма преобладала при использовании конструктора MSM (в 1,64 раза). Стоит отметить, что в конструкторе MSM достоверных различий в активности сплайсинга длинной и короткой форм *cFLIP* не выявлено (Рис.18).

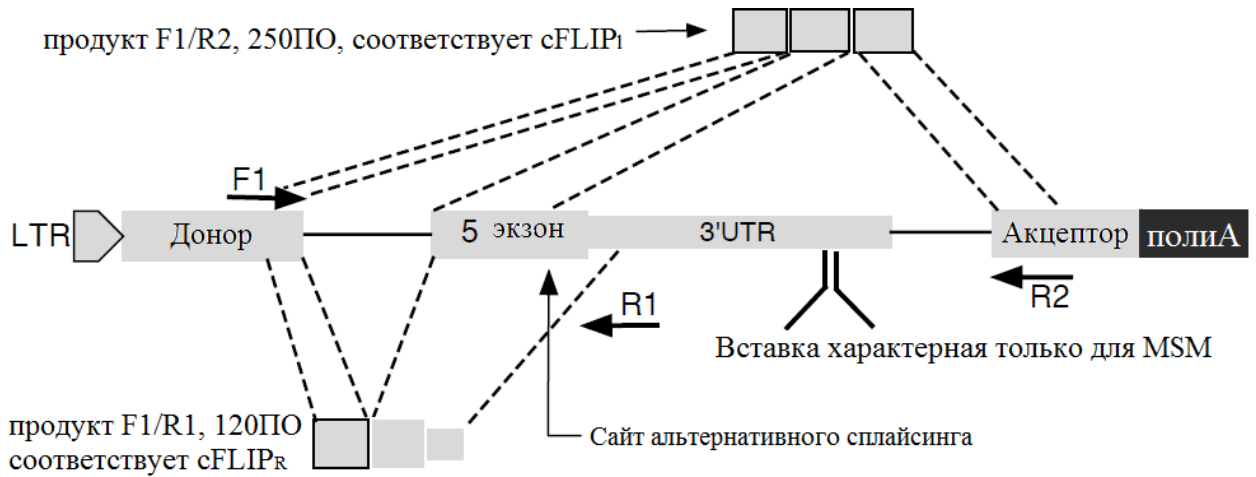


Рис.17. Расположение клонированного 5-го экзона cFlar в pET01 и основных элементов.

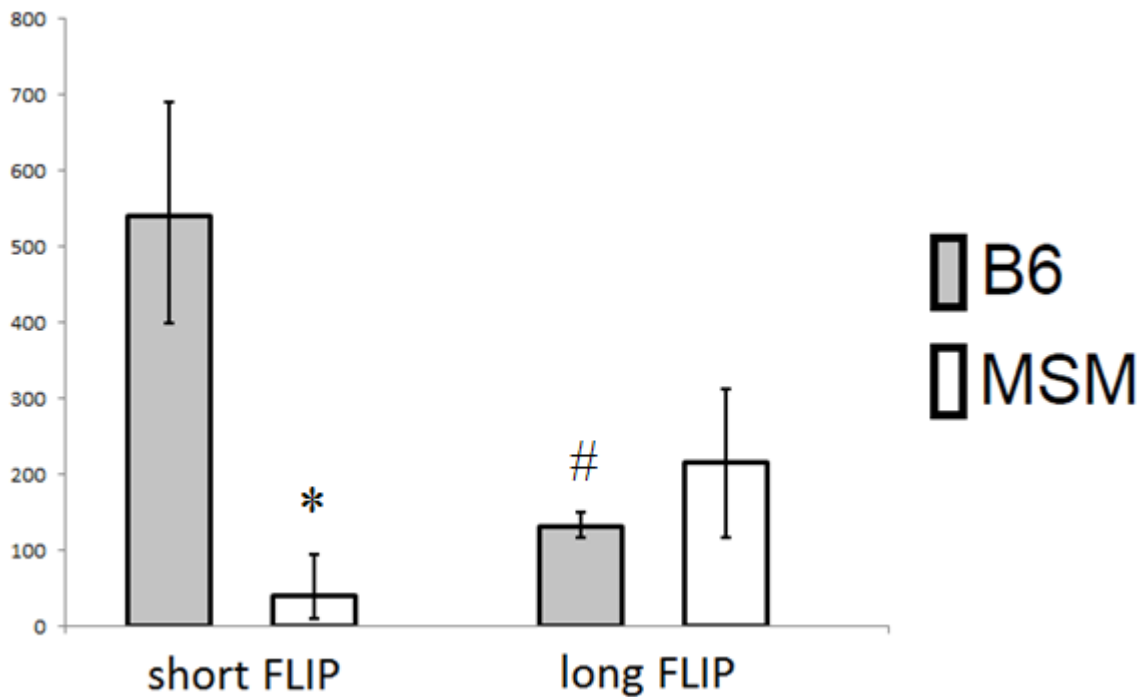


Рис. 18. Данные qPCR анализа различных форм cFLIP, амплифицированных с праймерами F1/R1 или F1/R2. Образцы получены из печени мышей после инъекции плазмид, кодирующих 5й локус cFlar. Нормализация данных велась относительно гена Gapdh.

Условные обозначения: данные представлены в виде среднего, максимального и минимального значений. * - отличия от мышей линии C57BL/6 достоверны, # - показатель достоверно отличается от показателя короткой формы.

3.3 Влияние полиморфизма *cFlar* на CASP8 и RIP1

Для определения эффекта, обусловленного высокими уровнями *cFLIP_L* в печени мышей линии MSM, были проанализированы уровни экспрессии белков CASP8, FLIP и RIP1. Прежде всего, было исследовано содержание изоформ p43 и p55 CASP8 в печени мышей линий C57BL/6 и MSM. Уровни изоформ оказались весьма близки у контрольных мышей C57BL/6, но имел место значительный сдвиг в сторону p43 при инъекции Jo2 (Рис. 19). В случае с мышами MSM наблюдалась практически исключительно форма p43, а Jo2 не оказывал влияния. Гибриды 1-го поколения изучаемых линий вели себя сходно с линией MSM, экспрессируя в основном p43 CASP8.

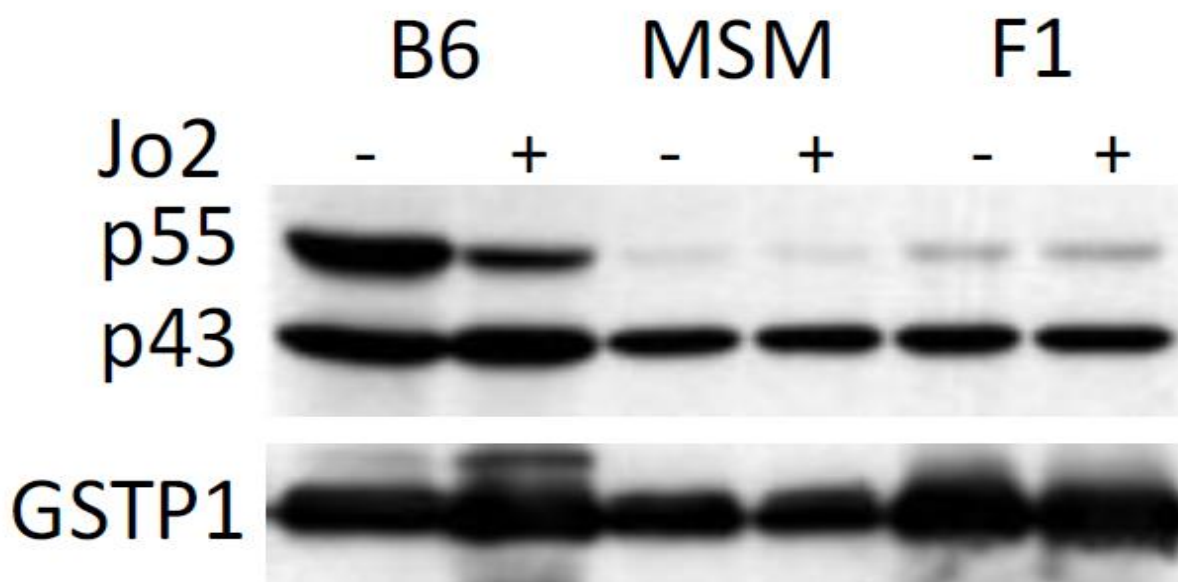


Рис. 19. Вестерн-блот анализ форм каспазы 8 в печени мышей при стимуляции 10мкг Jo2 интраперитонеально. Использовались линии MSM, C57BL/6 и их гибриды 1-го поколения (F1). Условные обозначения «+» - стимуляция присутствовала, «-» - стимуляция отсутствовала.

При введении Jo2 относительное количество длинной формы *cFlip* к короткой в печени мышей возрастало. Так, в состоянии покоя оно составляло 3,86, через час после введения препарата 6,4, а через 6 часов уже 6,78. У мышей C57BL/6 наблюдалась иная динамика с пиком через 1 час после инъекции. Значения были 1,06, 1,68 и 1,32, соответственно. В связи с относительно низкими уровнями короткой формы *cFLIP* в печени MSM относительно C57BL/6, а также согласуясь с данным анализа мРНК *cFLIP*

(рисунки 15 – 18, 20), можно смело утверждать, что длинная форма является доминантной в печени мышей линии MSM.

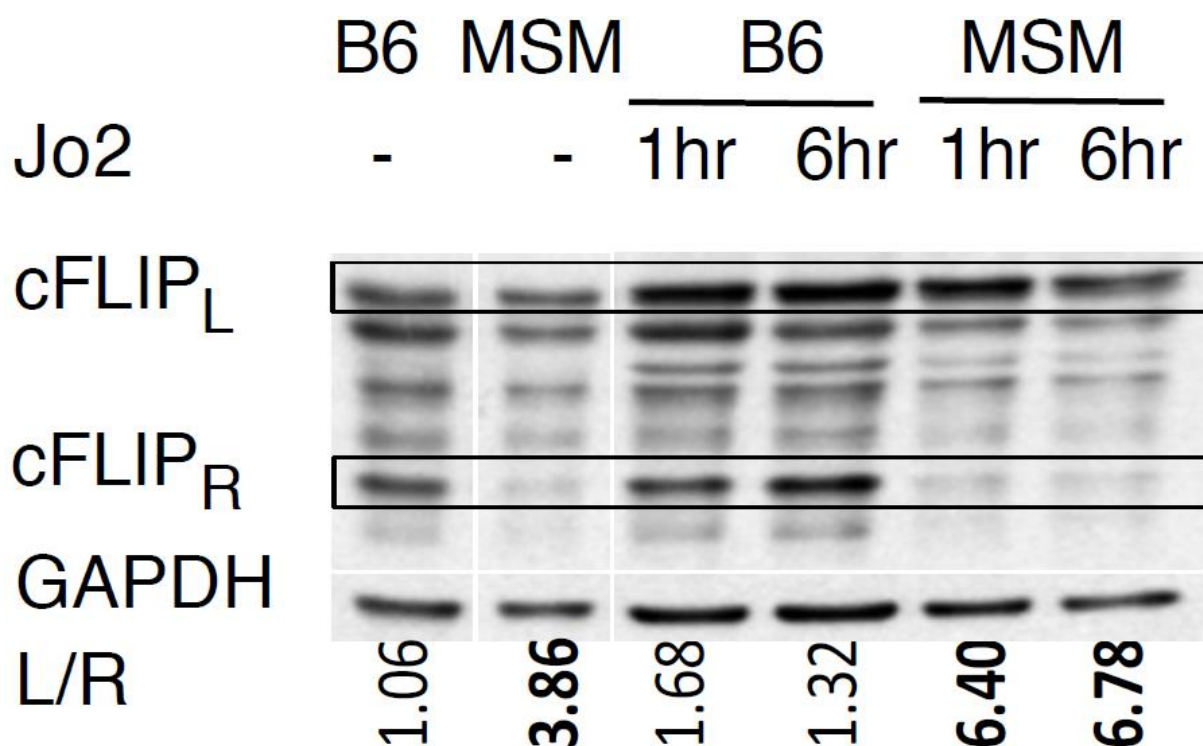


Рис.20. Соотношение изоформ cFlip в печени мышей MSM и C57BL/6 при введении Jo2 через 1 и 6 часов.

Для подтверждения предположения о специфичности повышенной устойчивости клеток печени MSM, было решено проверить уровни CASP8, RIP1 и cFLIP (Рис. 21) в различных органах мышей исследуемых линий. RIP1 использовался как индикатор протеолитической активности гетеродимера p43 CASP8/cFLIP в связи с тем, что этот комплекс разрезает RIP1 в не стимулированных клетках для поддержания их гомеостаза (Micheau et al., 2002). Уровни экспрессии белка в печени мышей сильно отличались от других органов. Это дополнило причину фокусировки исследования на ней. Уровень короткой формы cFLIP и p55 CASP8 был достоверно ниже у мышей линии MSM, чем у C57BL/6 (Рис. 22), а вот уровень RIP1-CL, наоборот. Интересно, что уровни регуляторных протеинов XIAP и CIAP2 были близки во всех пробах.

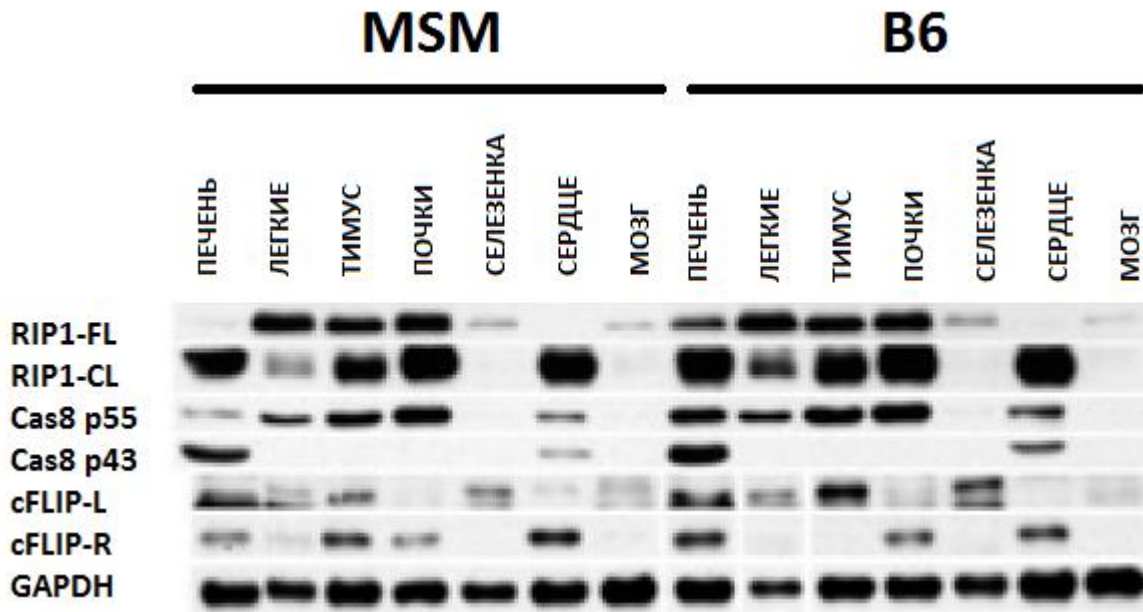


Рис. 21. Тканеспецифичность фрагментации ферментов в зависимости от линии мышей. Вестерн-блотт.

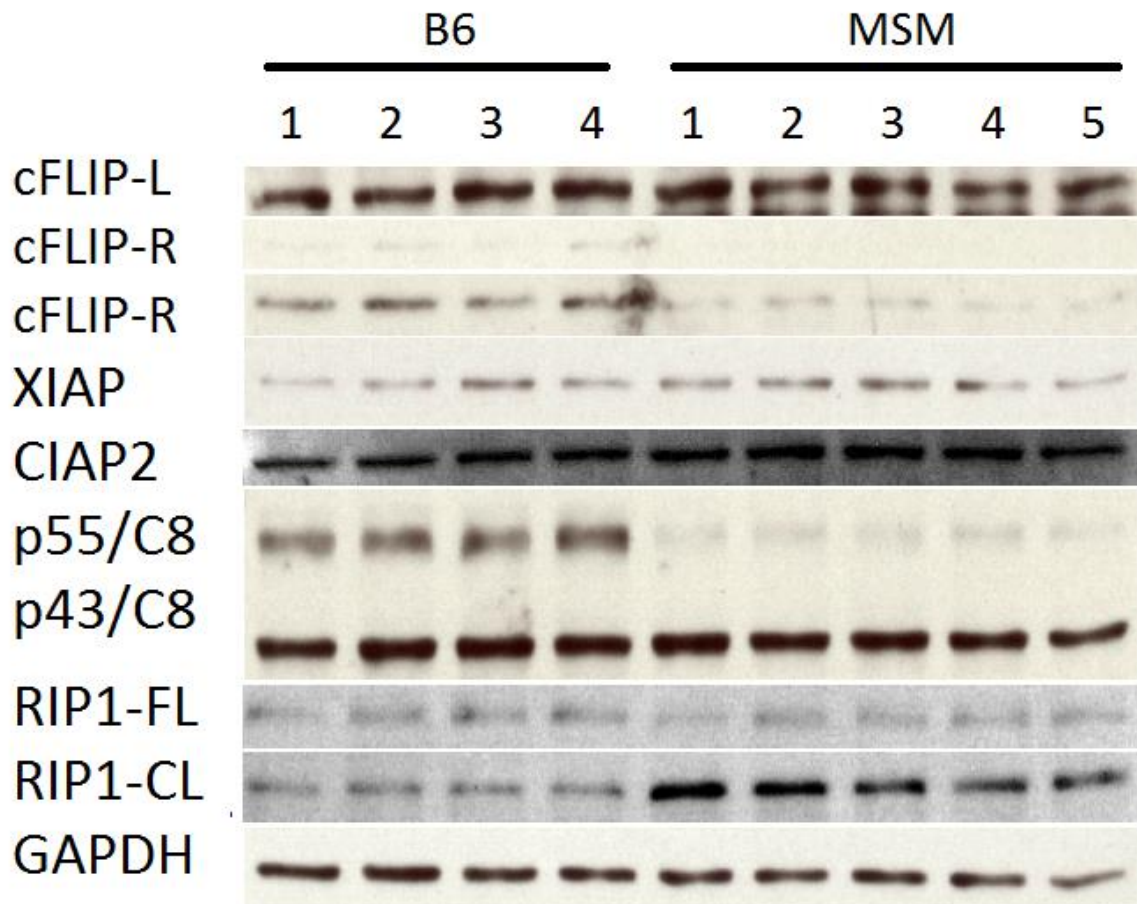


Рис. 22. Вестерн-блотт различных апоптотических компонентов в печени мышей одного возраста, но разных линий без стимуляции. 4 особи линии C57BL/6 и 5 MSM.

Для дальнейшего изучения взаимодействия cFLIP с CASP8, белок был иммунопреципитирован из проб печени мышей обеих линий без стимуляции, и затем проанализировано количество связанных им CASP8 и RIP1. Образцы из печени MSM показали, что гетеродимеры, преимущественно находятся в состоянии p43, а вот в печени C57BL/6 присутствовали обе формы в эквивалентном количестве (Рис. 23).

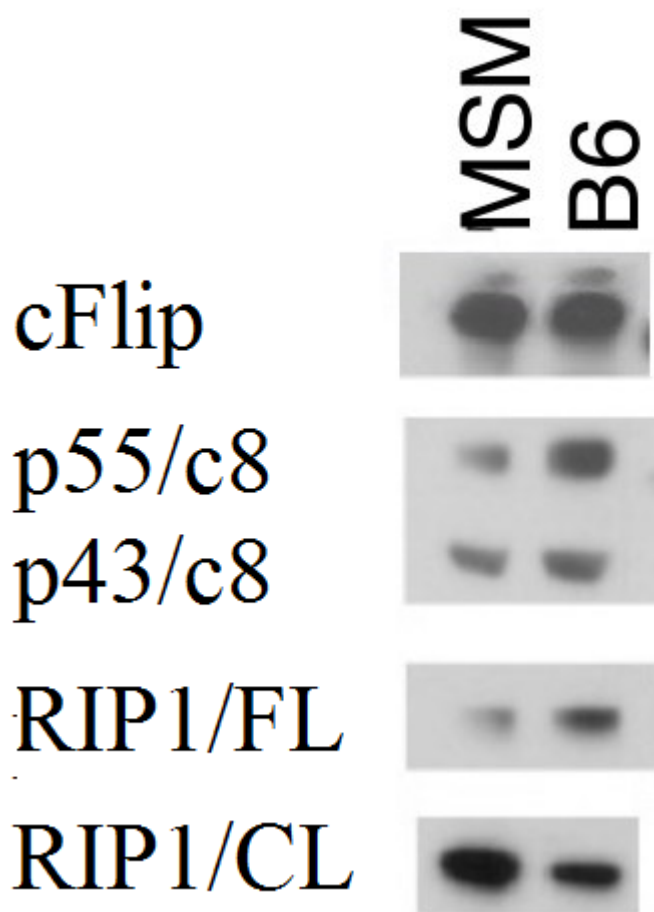


Рис. 23. Вестерн-блотт cFlip, изоформ каспазы 8 и RIP1 после иммунопреципитации печеночного лизата мышей линий MSM и C57BL/6.

Для изучения специфичности процессинга у линий мышей и для определения роли инсерции в 21 п.н. в выживании у мышей MSM были выведены мыши N5F3 *cFlar*^{MSM/MSM}. Для этого гибриды первого поколения 5 раз скрещивались с C57BL/6, с отбором гетерозигот по искомому гену. Далее потомство N5 подверглось интеркроссному скрещиванию, и в результате были отобраны мыши с геномом, на 97% аналогичным C57BL/6 и гомозиготным по участку с изучаемой инсерцией. При сравнении паттернов экспрессии белков печени полученных гибридов с чистыми

линиями C57BL/6 и MSM, показатели были более близки к MSM (Рис. 24). В частности, конгенные мыши показывали низкие уровни короткой формы cFLIP, p55 CASP8, и высокие уровни длинной формы cFLIP, если сравнивать с линией C57BL/6. Фрагментация RIP1 также протекала по типу мышей родительской линии MSM.

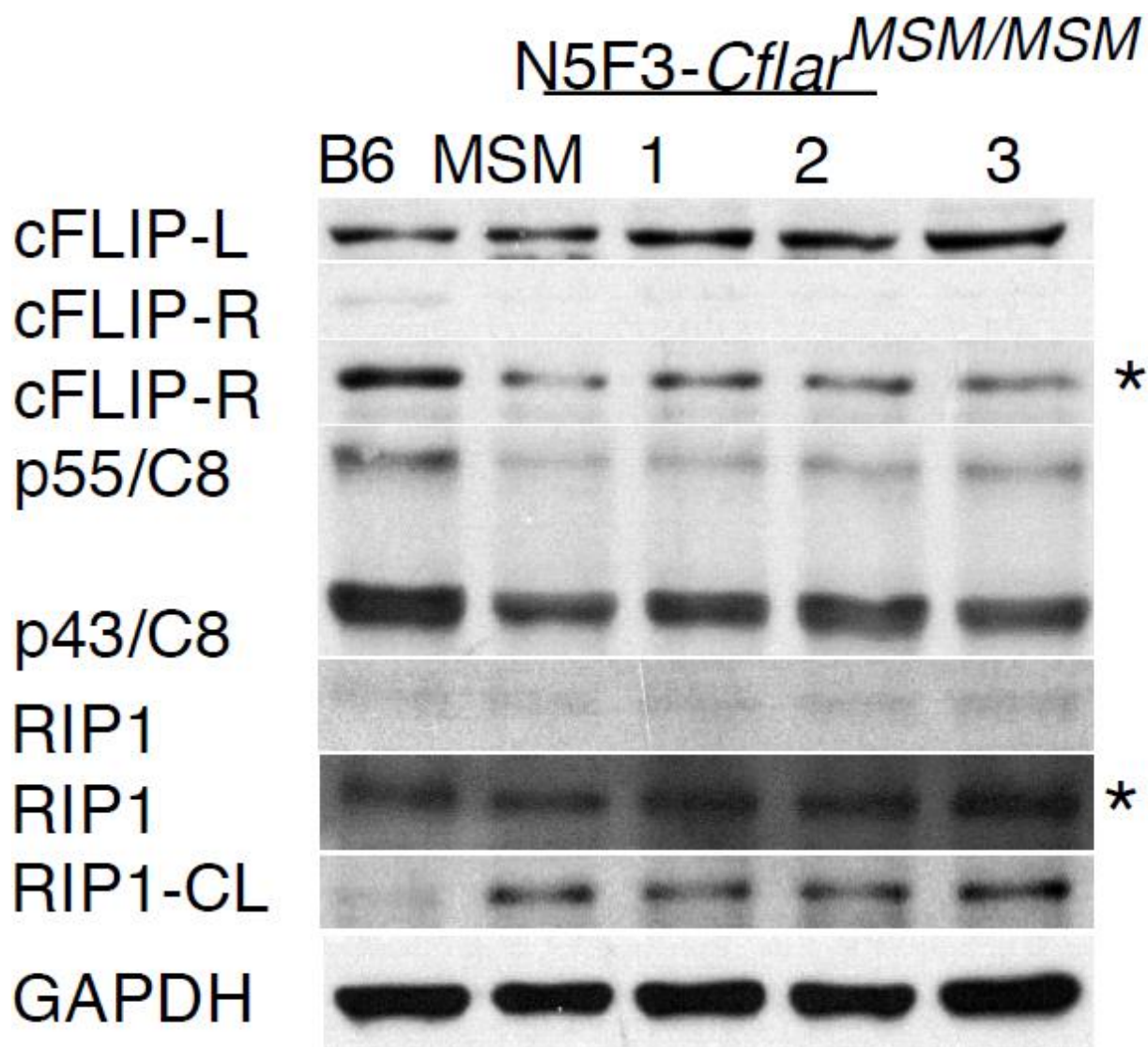


Рис. 24. Вестерн-блотт cFLIP, CASP8 и RIP1 из печени не стимулированных мышей N5F3 *cFlar*^{msm/msm}.

Условные обозначения: * - образцы, продублированные с более интенсивной выдержкой.

3.4 Влияние STING на синтез интерферонов

Для доказательства экспрессии STING в мышинных Т-клетках, был проведен иммуноблоттинг лизата. Так, его содержание оказалось сопоставимо или даже выше, чем в макрофагах (Рис. 25).

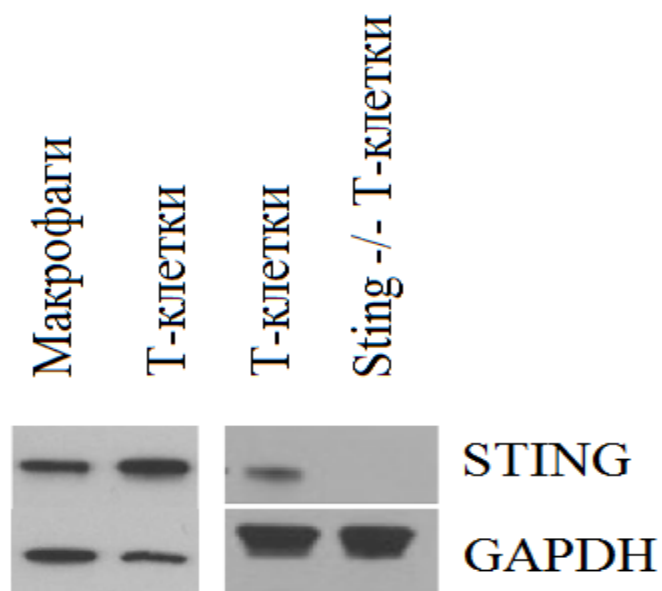


Рис. 25. Вестерн-блотт на наличие белка STING в различных клетках мышей. Правая и левая фариграммы проводились отдельно.

При воздействии DMXAA на Т-клетки мышей линии C57BL/6 наблюдался повышенный уровень экспрессии некоторых генов, связанных с регуляцией уровня IFN (IFIT1, IFIT2, MX2). В контрольной группе (отсутствие воздействия) и группах с нокаутированным STING, уровень экспрессии был близок к нулю (Рис. 26).

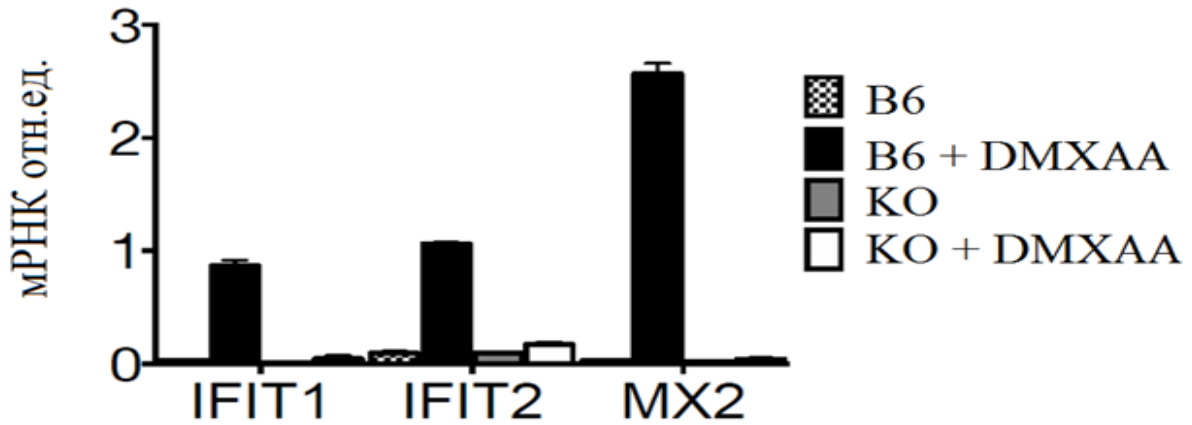


Рис. 26. Содержание мРНК генов, регулирующих уровень интерферона у мышей при воздействии DMXAA или нокауте гена *STING*.

Воздействие R'S'cGAMP на Т-клетки мышей линии C57BL/6 значительно увеличивало уровень экспрессии IFIT2. А в клетках с нокаутированным *STING* таких различий не наблюдалось (Рис. 27).

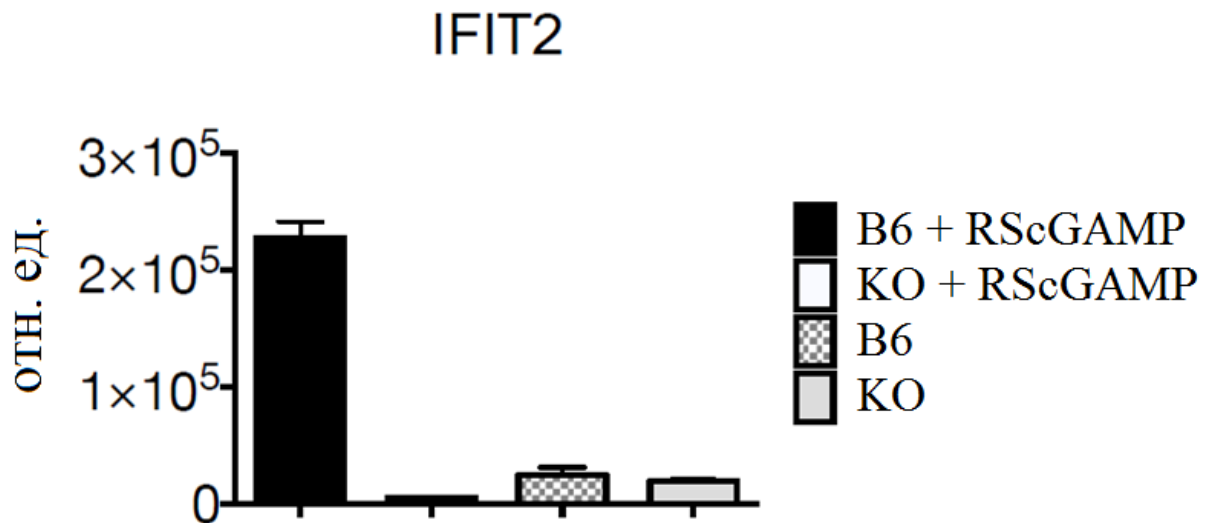


Рис. 27. Уровень экспрессии IFIT2 в Т-клетках обычных и нокаутных по *STING* мышей при активации клеток R'S'cGAMP.

Кроме увеличения экспрессии ISGs, DMXAA индуцировал и *STING*-зависимый синтез IFN- β и IFN- γ (Рис. 28).

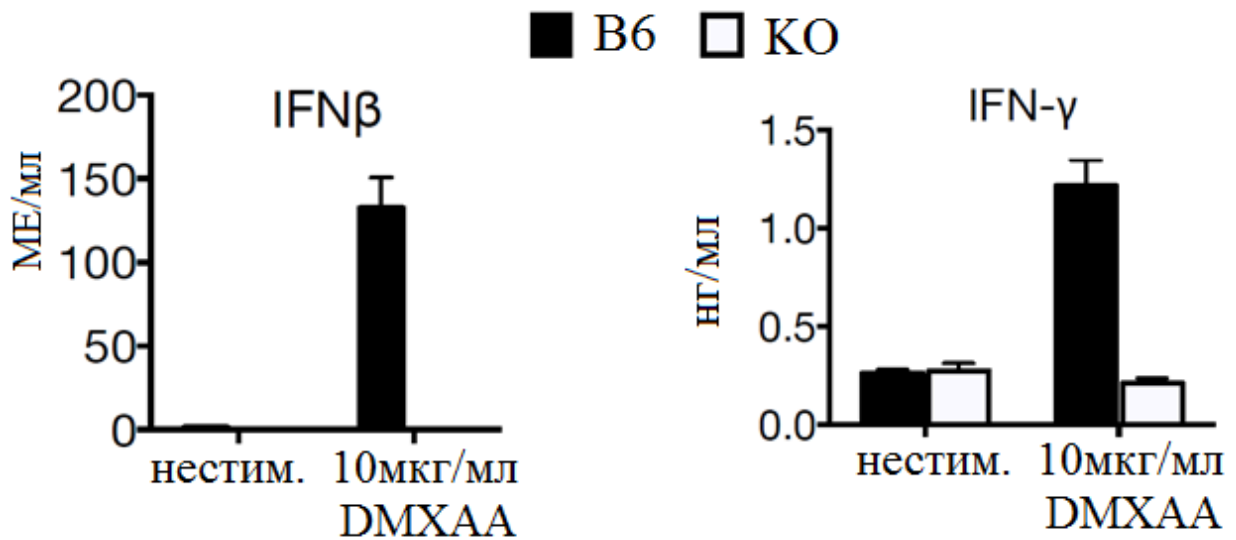


Рис. 28. Уровень синтеза $IFN-\beta$ и $IFN-\gamma$ в Т клетках обычных и нокаутных по $STING$ мышей при активации клеток DMXAA.

Более того, сочетанная с анти-CD3/CD28 активация DMXAA увеличивала уровень синтеза $IFN-\beta$ относительно активации чистым веществом (Рис. 29). Также следует отметить, что $CD4+$ и $CD8+$ Т-клетки синтезировали $STING$ -зависимый $IFN-\beta$, а вот $IFN-\gamma$ только первая группа (Рис. 30).

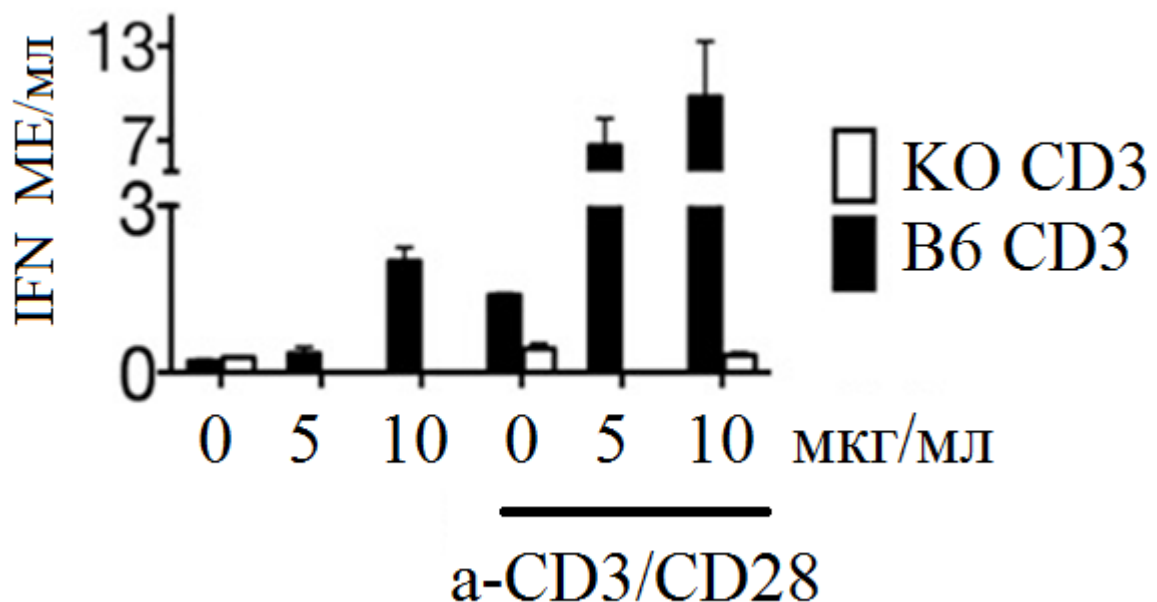


Рис. 29. Уровень синтеза $IFN-\beta$ и $IFN-\gamma$ в $CD3+$ клетках обычных и нокаутных по $STING$ мышей при активации клеток DMXAA и анти-CD3/CD28.

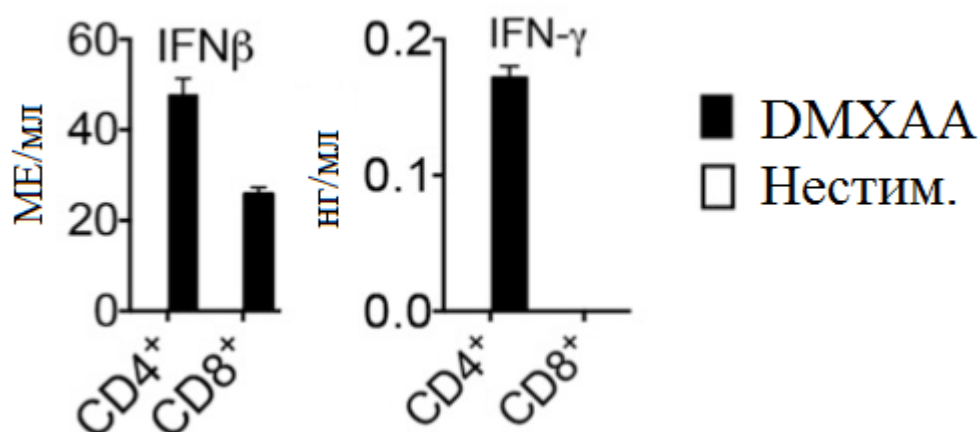


Рис. 30. Уровень синтеза $IFN-\beta$ и $IFN-\gamma$ в $CD4^+$ и $CD8^+$ T-клетках мышей при активации клеток DMXAA.

3.5 Влияние DMXAA на сигналинг в T-клетках

Воздействие DMXAA на T-клетки мышей линии C57BL/6 приводило к фосфорилированию IRF3 и TBK1, чего не наблюдалось в случае нокаута STING. Кроме того увеличивался уровень p-p38 и p-p65 (Рис. 31). Согласно полученным данным, содержание pp105 растет, а содержание p105 и p50 при этом остается неизменным (Рис. 32). К полученным данным следует добавить, что конституитивный процессинг p105 может оказывать скрывающий эффект на определяемое количество p50, даже когда он транскрипционно активен.

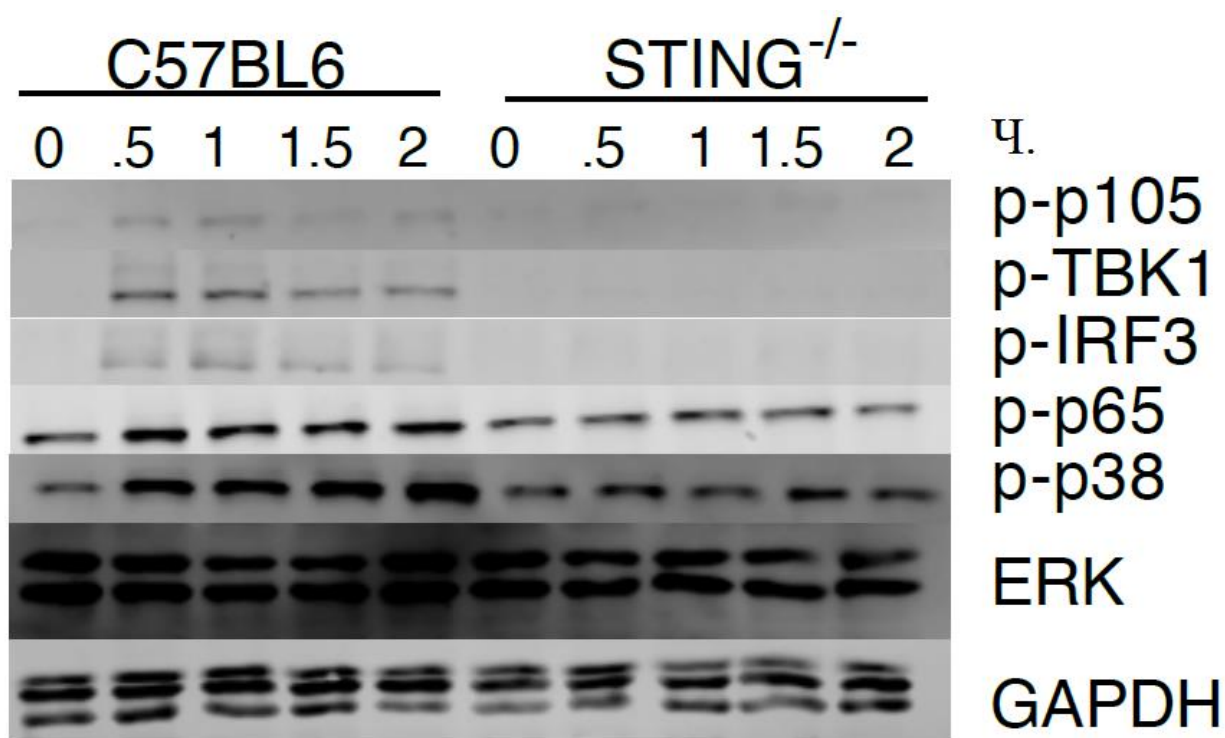


Рис. 31. Фосфорилирование TBK1-IRF3, NFκB и MAPK в T-клетках, активированных DMXAA.

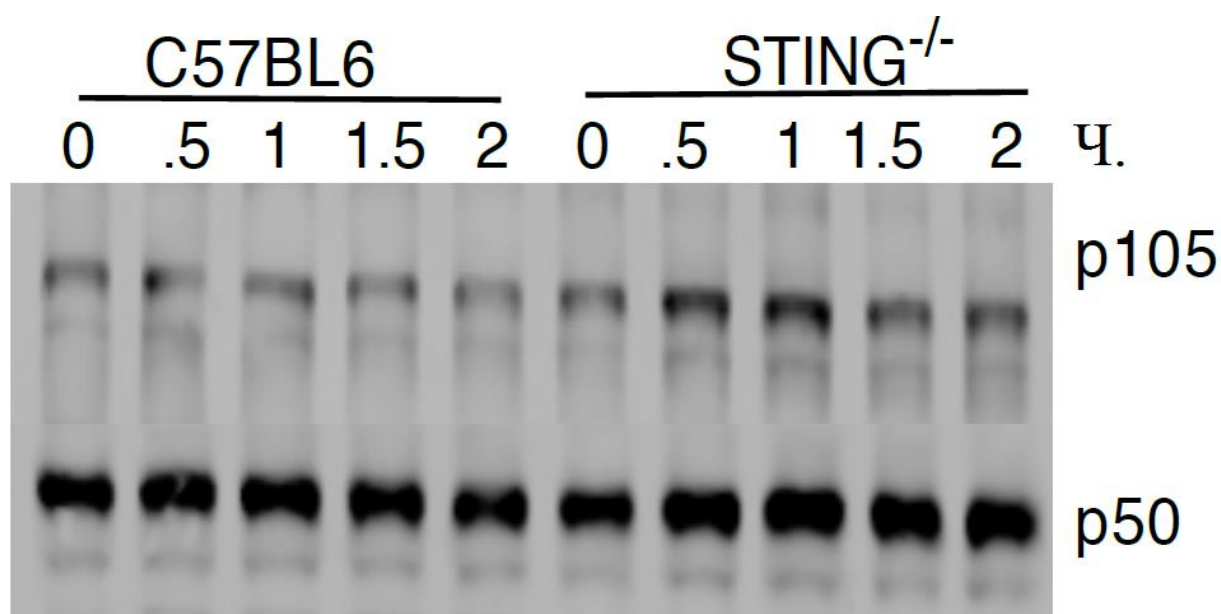


Рис.32. Содержание белков p105 и p50 семейства NFκB в T-клетках, активированных DMXAA.

T-клетки мышей, дефицитных по рецептору IFN типа 1, были полными фенотипическими копиями обычных мышей (Рис. 33), что позволило оценить влияние аутокринного интерферона на изучаемые процессы.

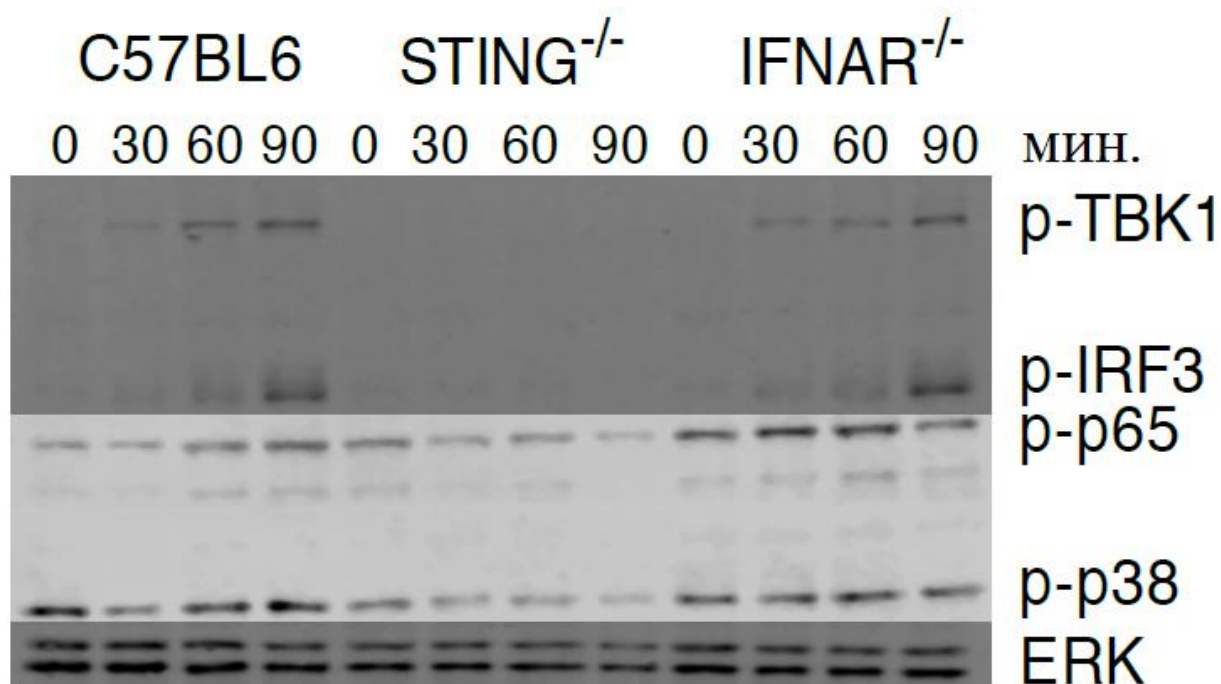


Рис. 33. Белки TBK1-IRF3 сигналинга в Т-клетках, активированных DMXAA.

Для изучения влияния лигандов TLR на Т-клетки, они обрабатывались анти-CD3 и анти-CD28 с добавлением DMXAA. В результате было обнаружено, что DMXAA усиливает STING-зависимое фосфорилирование p-TBK1 и p-IRF3 (Рис. 34). Остальные элементы, связанные с MAPK и NFκB перекрываются с явно аддитивным и, возможно, синергичным эффектом. Так, фосфорилирование p105 немного усиливалось за счет стимуляции ТКР в течение 60 минут как в клетках, полученных от мышей линии C57BL/6, так и в клетках мышей STING^{-/-}, а при добавлении DMXAA было сильнее и быстрее, но только в первых. Содержание p-p38 увеличивалось при добавлении DMXAA после активации ТКР только в Т-клетках мышей C57BL/6. Кроме того, как эти клетки, также, как и клетки мышей, дефицитных по STING, демонстрировали сильное увеличение значений p-ERK в ответ на анти-CD3 и анти-CD28, что в дополнение к наличию p-p65 демонстрирует наличие функционирующего сигналинга, расположенного ниже к ТКР в клетках STING^{-/-}, и не подвергающегося аддитивному эффекту при совокупной активации ТКР с DMXAA (Рис. 34).

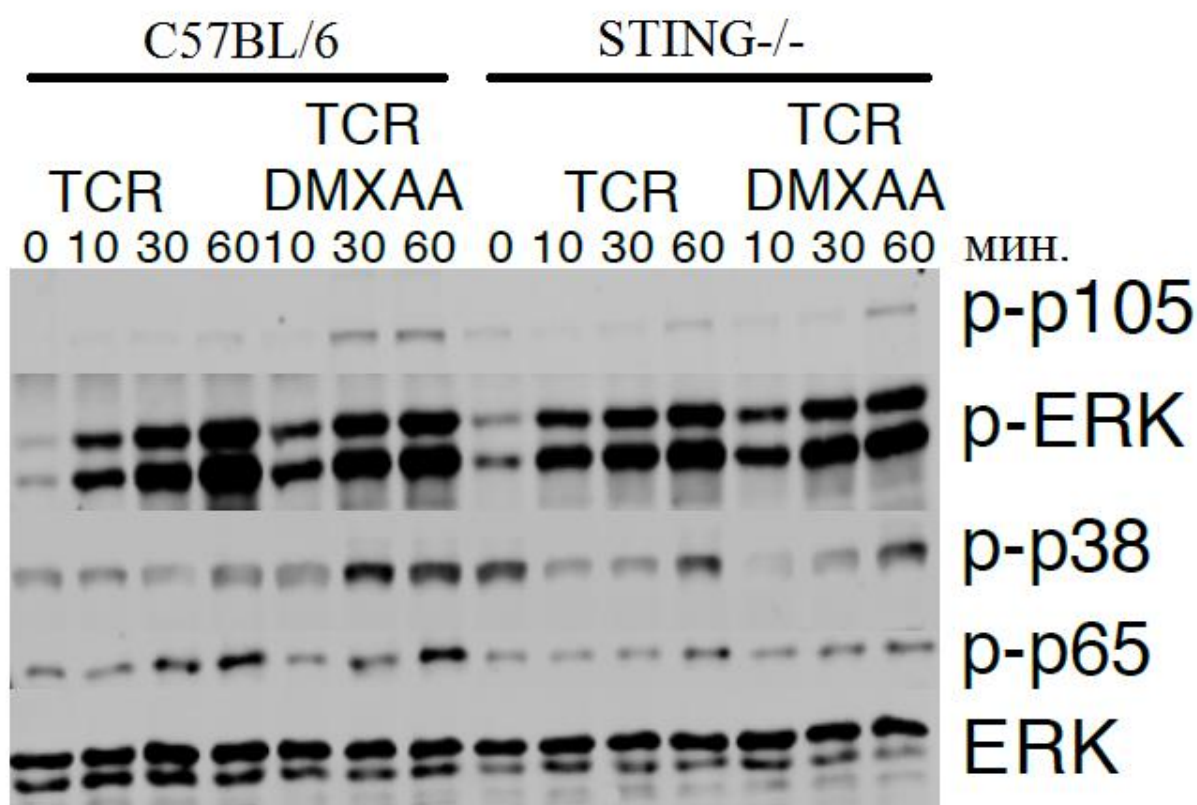


Рис. 34. Влияние времени стимуляции ТКР и ТКР+DMXAA на фосфорилирование различных белков в мышах дикого типа и нокаутных по STING.

Для определения основных различий при развитии Т-клеток сравнивались их популяции из тимуса и периферических лимфатических узлов CD4-CD8-, CD4+CD8+, а так же CD4+ и CD8+, так как экспрессия CD4 и CD8 в Т-клетках мышей C57BL/6 и нокаутных по STING достоверно не различалась (Рис. 35, 36).

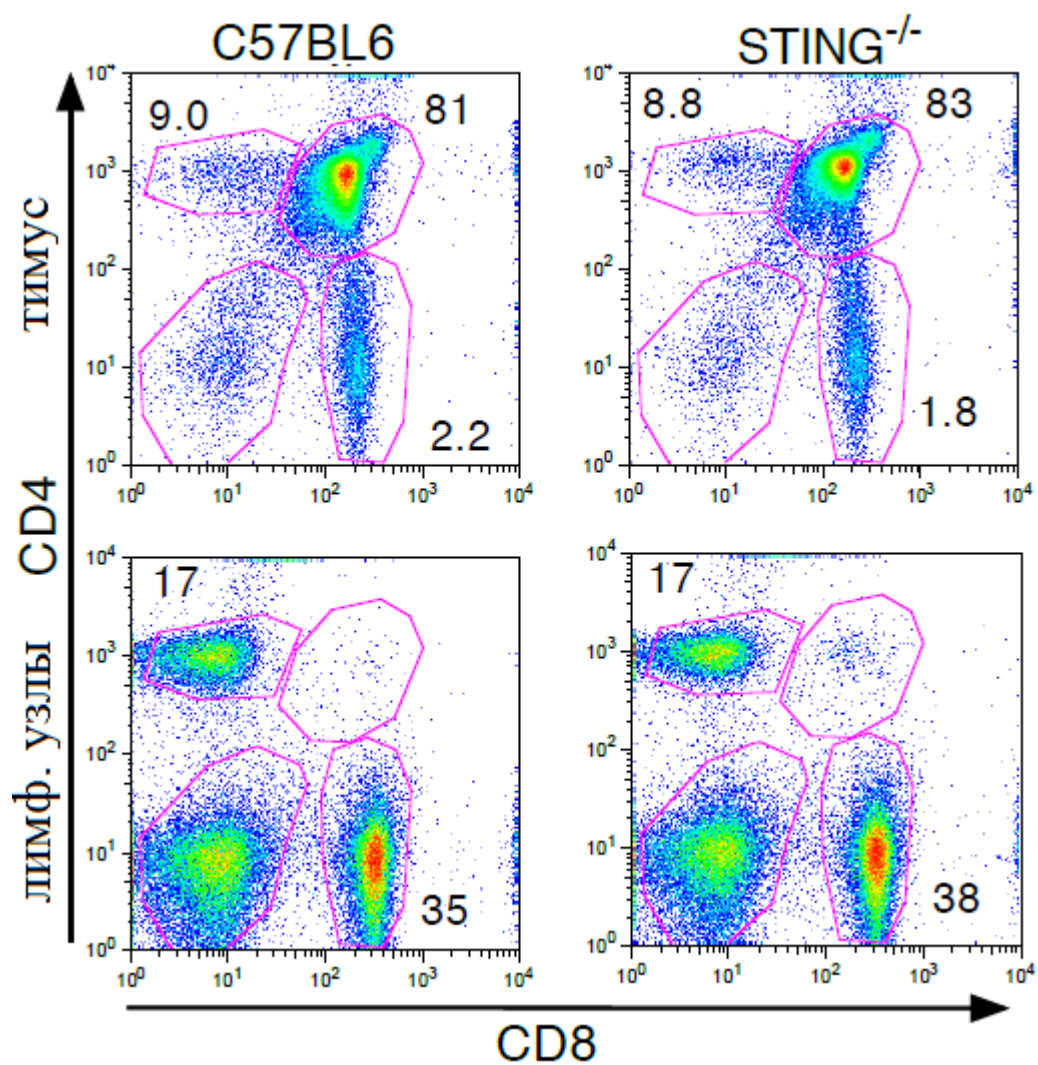


Рис. 35. Субпопуляции T-клеток в тимусе и периферических лимфатических узлах у мышей с нормальным и нокаутным *STING*.

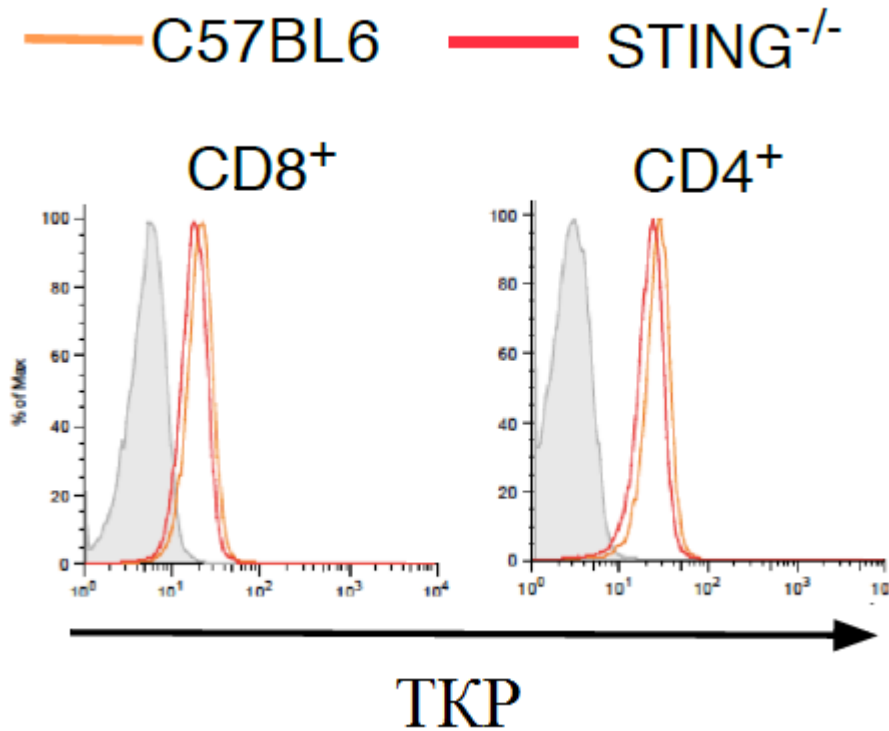


Рис. 36. Содержание ТКР T-клеток в периферических лимфатических узлах у мышей с нормальным и нокаутным *STING*.

Более того, значимых различий между обычной и нокаутной линиями среди наивных, регуляторных и T-клеток памяти не обнаружено (Рис. 37, 38).

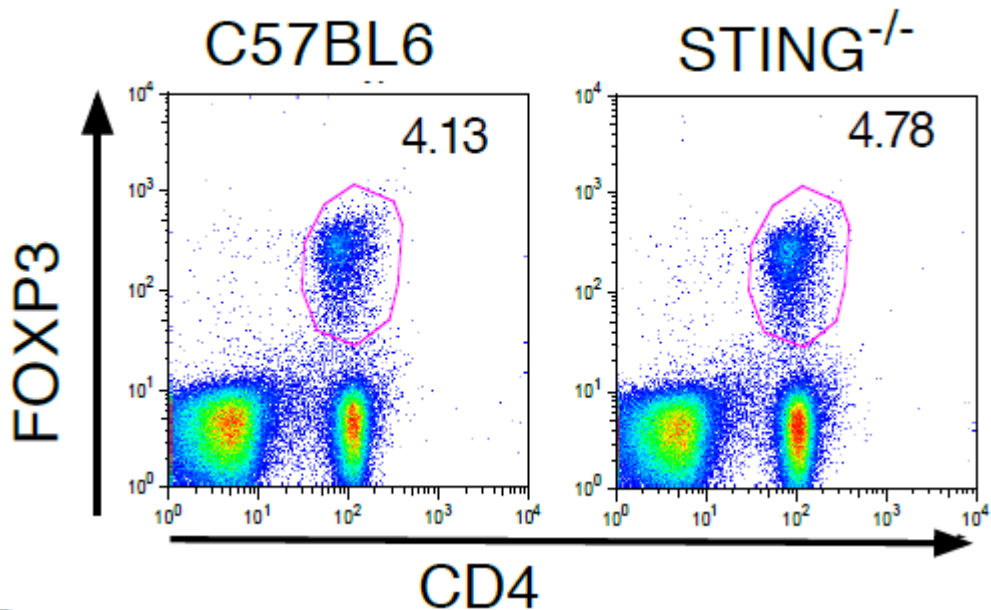


Рис. 37. Субпопуляции T-клеток в периферических лимфатических узлах у мышей с нормальным и нокаутным *STING*.

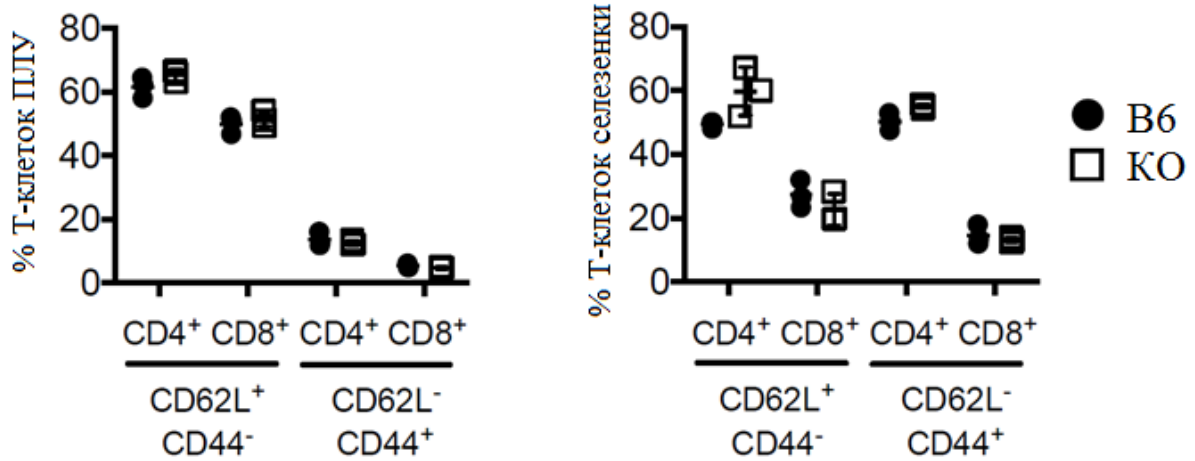


Рис. 38. Количество Т-клеток в периферических лимфатических узлах (ПЛУ) и селезенке у мышей с нормальным и нокаутным *STING*. (*CD62L⁺CD44⁻* - наивные Т-клетки; *CD62L⁻CD44⁺* - Т-клетки памяти)

Т-клетки мышей C57BL/6 и животных дефицитных по *STING* имели сопоставимые уровни экспрессии CD69 и CD25 при активации ТКР (Рис. 39).

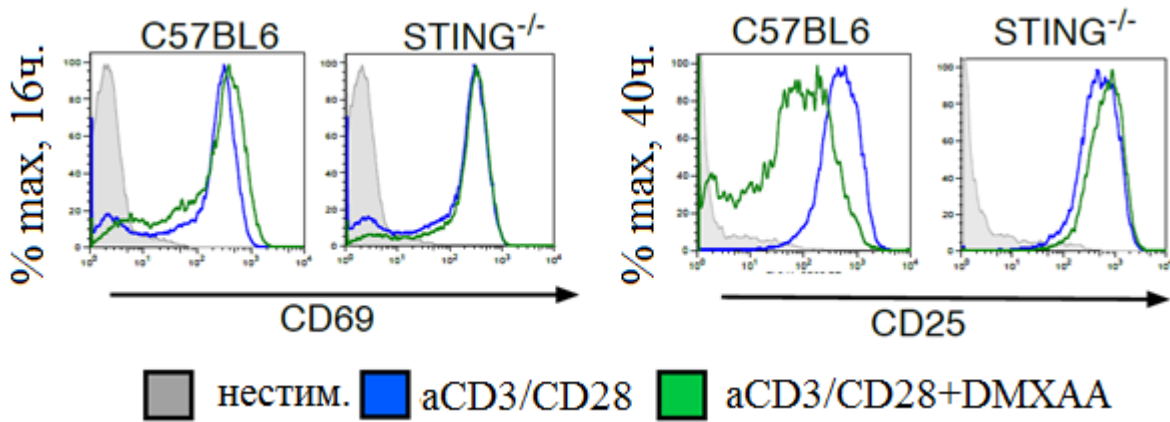


Рис. 39. Содержание ТКР в *CD3⁺* Т-клетках в у мышей с нормальным и нокаутным *STING* при активации различными компонентами.

При проверке влияния DMXAA на их активацию и пролиферацию при стимуляции ТКР было установлено, что DMXAA не оказывал эффекта на экспрессию CD69, однако через 40 часов после добавления наблюдалось снижение экспрессии CD25 (Рис. 39). Т-клетки из периферических лимфатических узлов от обеих групп мышей пролиферировали в равной степени в ответ на стимуляцию ТКР, DMXAA блокировал

этот эффект с клетками мышей C57BL/6, но не *Sting*^{-/-} (Рис. 40). Т-клетки IFNAR^{-/-} также не продемонстрировали роста в ответ на присутствие DMXAA.

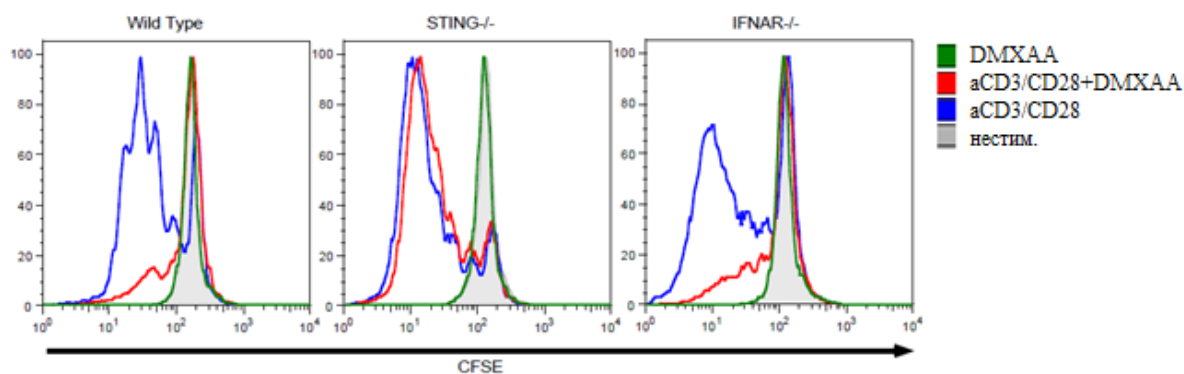


Рис. 40. Пролиферация Т-клеток из периферических лимфатических узлов.

Также вклад DMXAA был протестирован и при добавлении его на разных этапах после активации ТКР. Добавление DMXAA в течение первых суток полностью блокировало деление клеток, но при добавлении на вторые сутки наблюдалась некоторая доля пролиферирующих клеток (Рис. 41).

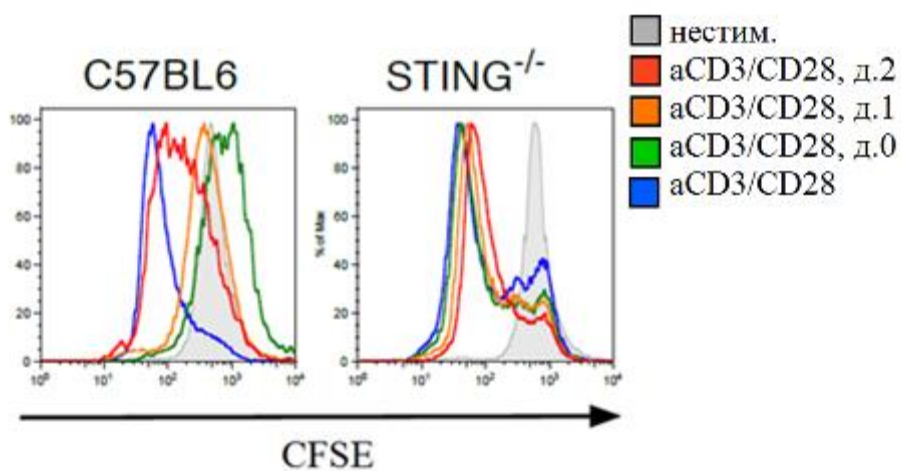


Рис. 41. Влияние времени добавления DMXAA на пролиферацию Т-клеток из периферических лимфатических узлов.

Для полноценного изучения активации STING в Т-клетках было проведено секвенирование наивных C57BL/6 и STING дефицитных CD3⁺ клеток, которые стимулировались анти CD3, анти CD28 и DMXAA, как по отдельности, так и в

различной комбинации. Полученные результаты согласуются с данными RT-PCR – DMXAA в чистом виде усиливает экспрессию группы ISG у нормальных мышей, а у дефицитных по STING такого влияния не наблюдается (Рис. 42).

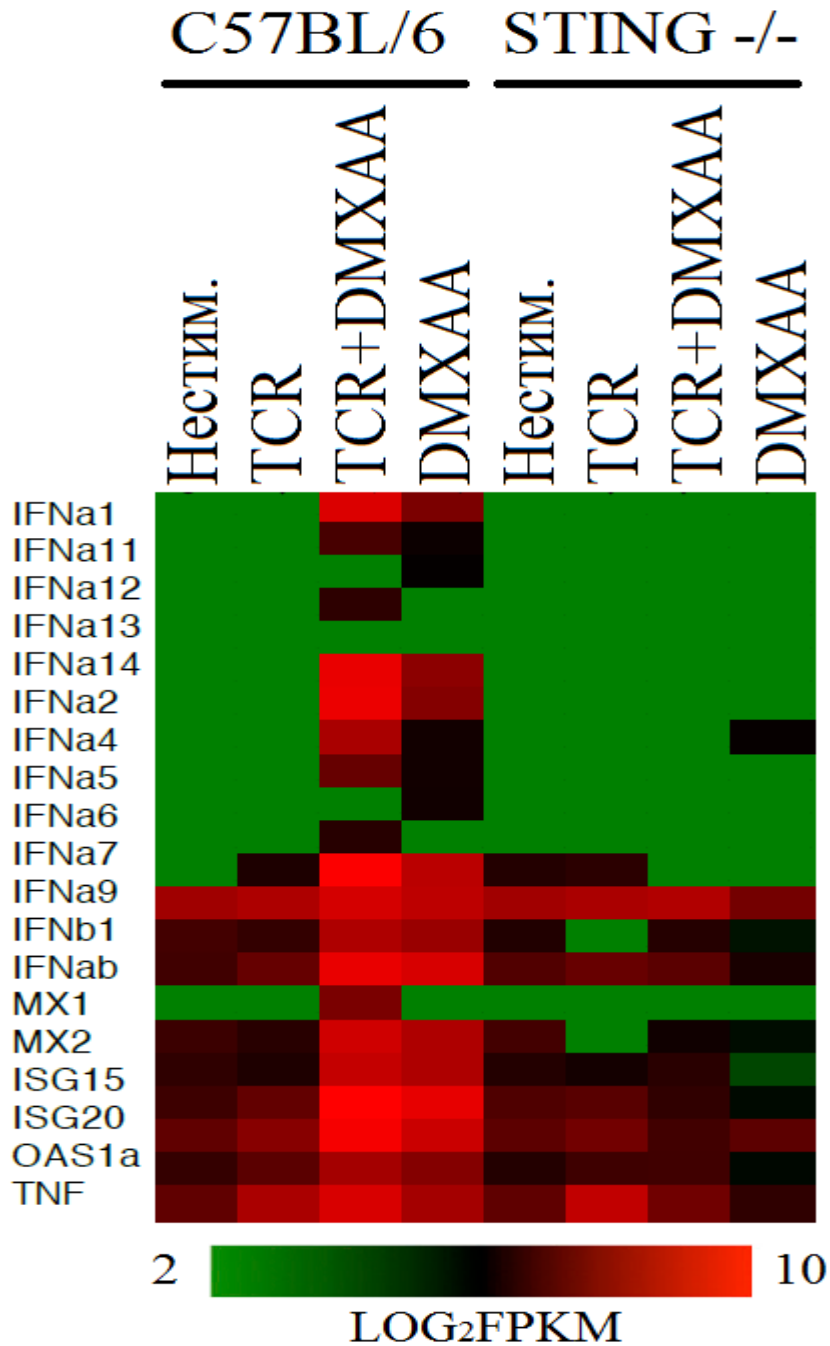


Рис. 42. Тепловая карта уровня экспрессии некоторых генов наивных C57BL/6 и STING дефицитных CD3⁺ клеток, которые стимулировались анти CD3, анти CD28 и DMXAA.

Анализ активации сигнальных путей в STING дефицитных Т-клетках в сравнении нормальными показал STING-зависимый скачок в путях апоптоза и каспазного каскада, а также снижение экспрессии IL-2 и генов клеточного цикла (Рис. 43). Кроме того,

активация ТКР в нормальных и *STING* дефицитных Т-клетках без DMXAA приводила к сопоставимому увеличению экспрессии антиапоптотических (в том числе, *BCL2*) и снижению проапоптотических (*BAX*) генов. При добавлении DMXAA картина смещалась в сторону *STING*-зависимой активации (Рис. 44), снижая уровень экспрессии *BCL2* и повышая *BAX* только в Т-клетках мышей C57BL/6.

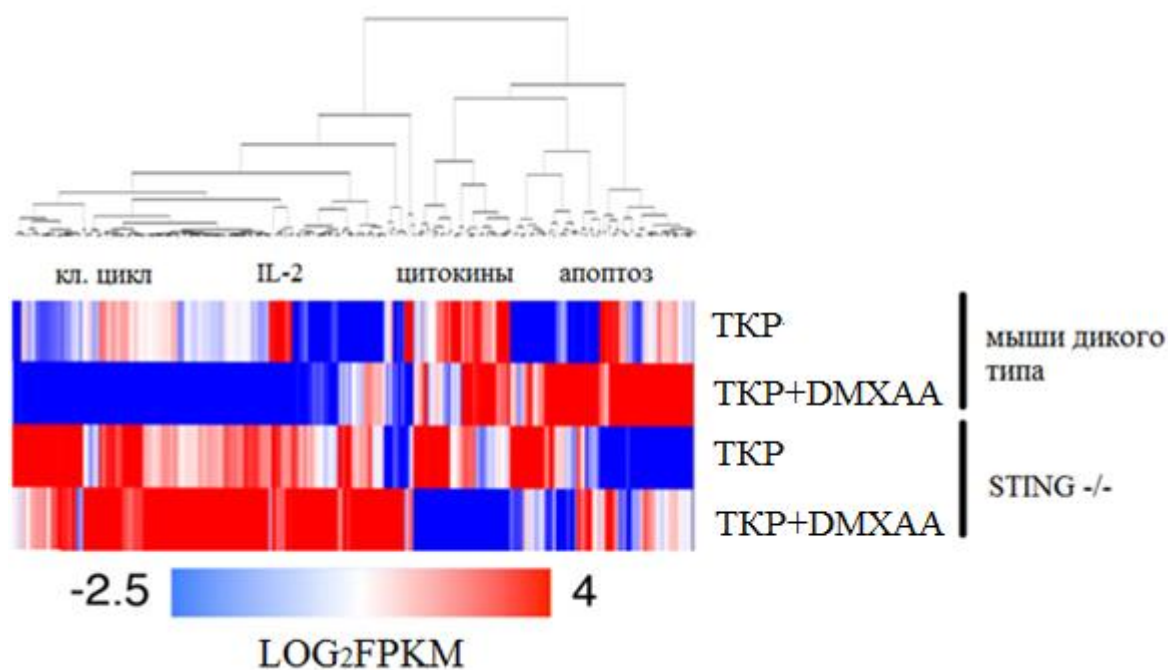


Рис. 43. Тепловая карта и дендрограмма уровня экспрессии некоторых групп генов CD3⁺ Т-клеток мышей при различных воздействиях.

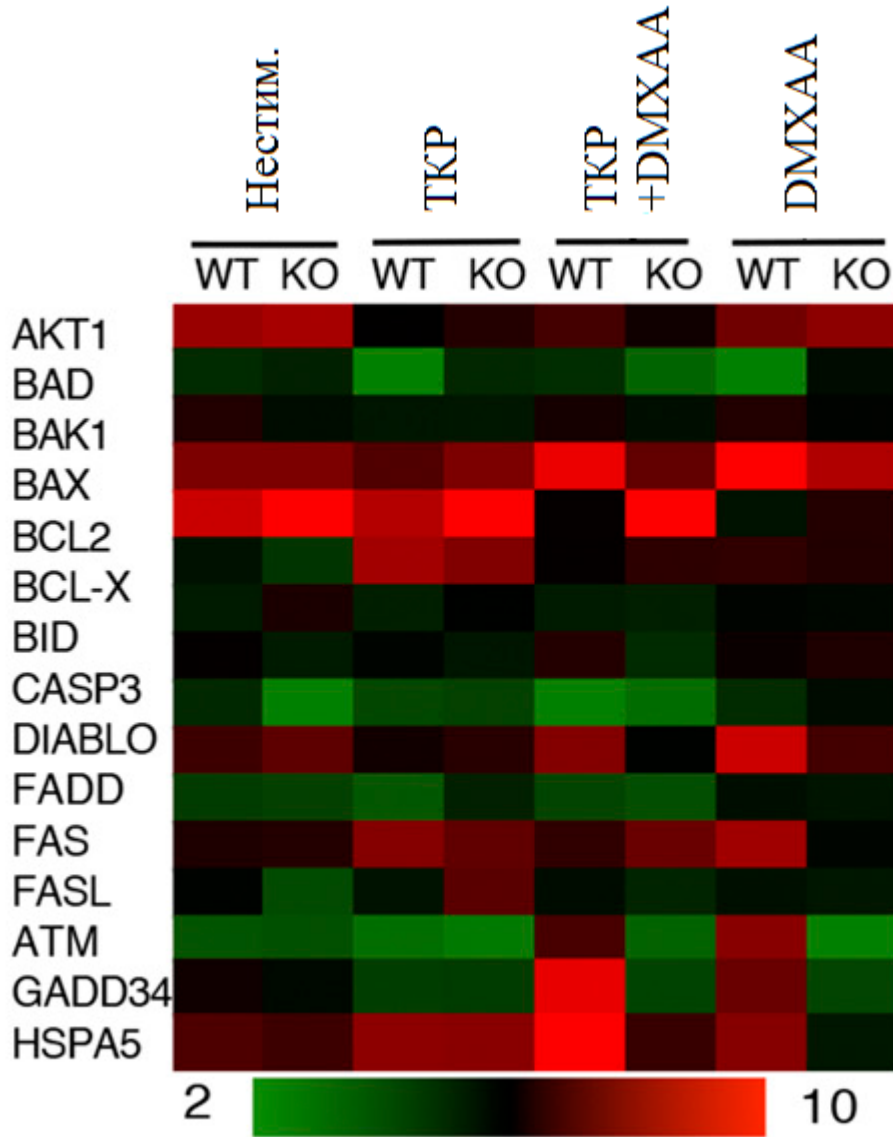


Рис. 44. Тепловая карта уровня экспрессии некоторых генов наивных C57BL/6 и STING дефицитных CD3⁺ клеток, которые стимулировались анти CD3, анти CD28 и DMXAA.

Сравнение активации путей сигналинга показало значительные различия между макрофагами и STING дефицитными Т-клетками, в отличие от Т-клеток C57BL/6 и STING дефицитных (Рис. 45). Летальность, индуцированная цДН в клетках врожденного иммунитета, не наблюдалась.

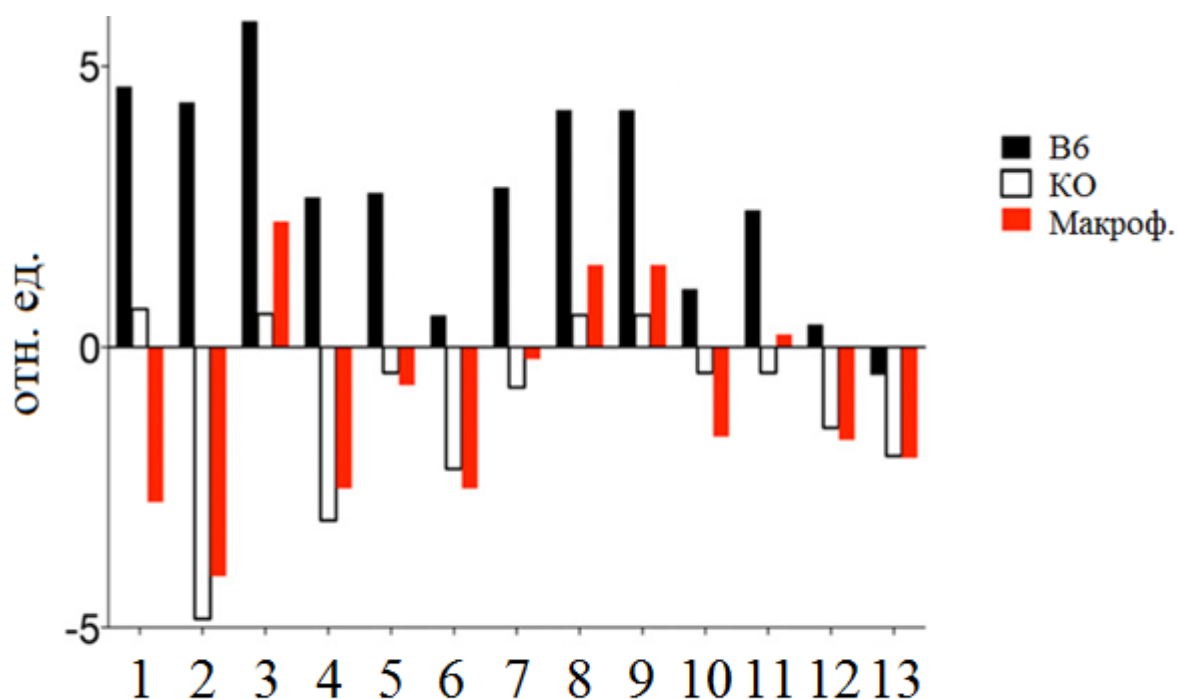


Рис. 45. Активация сигнальных путей в Т-клетках и макрофагах при воздействии STING.

Условные обозначения. Цифрами по оси абсцисс указаны: 1 – клеточный апоптоз, 2 – каспазный каскад, 3 – митохондриальный апоптоз, 4 – фрагментация ДНК, 5 – экспрессия апоптотических генов, 6 – митохондриальная фрагментация ДНК, 7 – IGF1R сигналинг, 8 – деполяризация, 9 – апоптоз TP53, 10 – апоптотическая деполяризация, 11 – ATM апоптоз, 12 – NGF апоптоз, 13 – TGF-beta апоптоз.

И в нормальных Т-клетках, и в STING-дефицитных наблюдается резкий скачок экспрессии IL-2 при активации ТКР, однако заблокировать его с помощью DMXAA удавалось только в нормальных Т-клетках (Рис. 43).

Анализ сигнальных путей показал, что гены UPR, в частности Bip/HSPA5 и GADD, были сильно апрегулированы, как и ISGs (Рис. 44).

3.6 Влияние STING на элиминацию клеток

Для проверки гипотезы, что DMXAA может активировать проапоптотический сигналинг STING-опосредованно и, возможно, индуцируя UPR. Т-клетки инкубировались с DMXAA, а после этого определялась доля погибших. Внесение DMXAA к анти-CD3 и анти-CD28 активированным Т-клеткам приводило к большей наблюдаемой смерти клеток, чем у образцов без добавления вещества. С другой

стороны, у STING-дефицитных клеток, наблюдалось преимущественное выживание клеток. Для того чтобы определить тип смерти, аналогичная процедура была проведена и с добавлением ингибитора каспаз zVAD-fmk, а также ингибитора некроптоза Nec1 (Рис. 46). Самостоятельно ни один из этих компонентов не мог препятствовать клеточной гибели, обусловленной добавлением DMXAA, однако совокупно они достоверно снижали показатель элиминации. Стоит отметить, что защита от клеточной смерти выше обозначенными ингибиторами апоптоза и некроптоза ограничена в связи с их коротким периодом полураспада, поскольку ни один из них, ни их комбинация не способны вернуть пролиферативные показатели при совокупном введении с DMXAA в норму (Рис. 47).

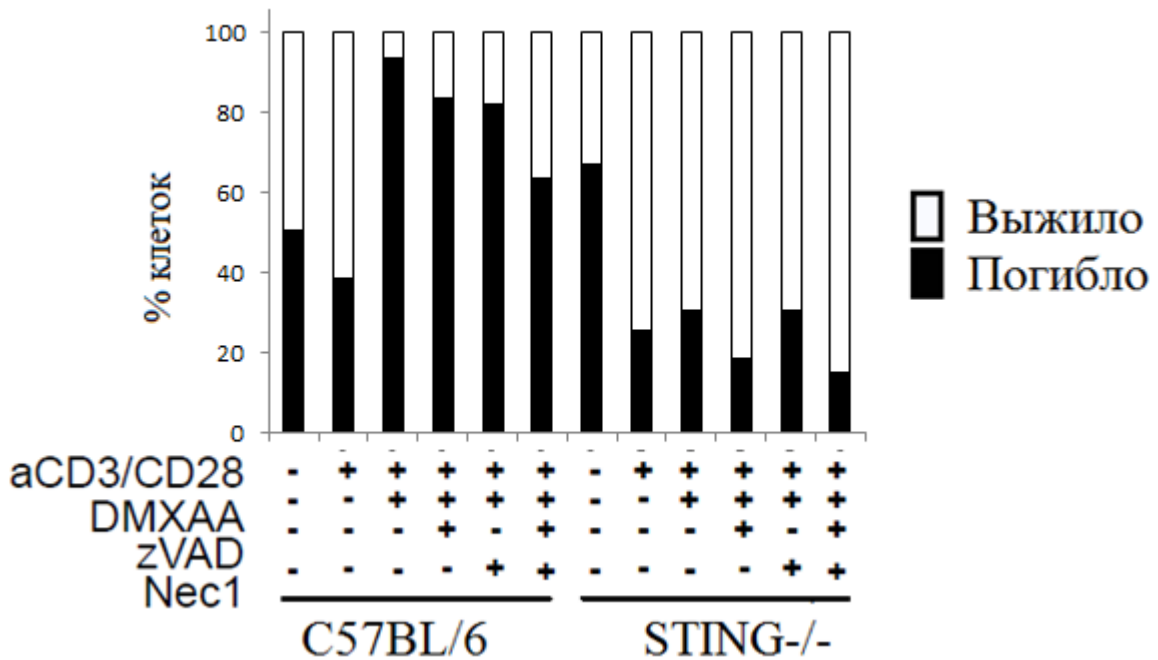


Рис. 46. Выживаемость Т-клеток STING дефицитных мышей и нормальных мышей линии C57BL/6, которые стимулировались анти CD3, анти CD28, DMXAA, zVADu Nec1.

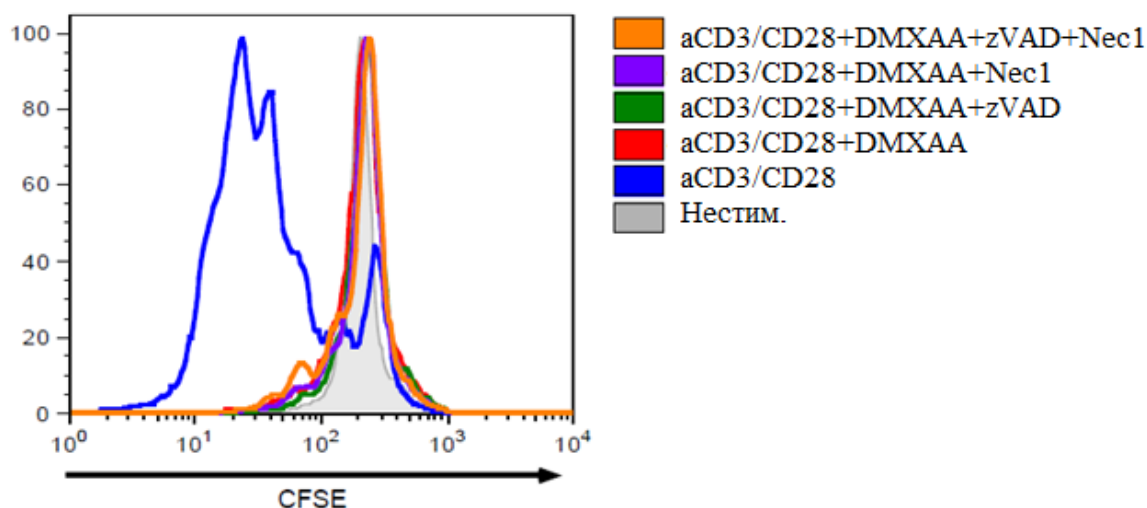


Рис. 47. Пролиферация Т-клеток *STING* дефицитных мышей и нормальных мышей линии *C57BL/6* при стимуляции анти *CD3*, анти *CD28*, *DMXAA*, *zVAD* и *Nec1*.

Для того, чтобы определить, насколько *DMXAA*-индуцированная клеточная смерть требует сочетанной активации ТКР (Green, Droin, Pinkoski, 2003), был протестирован эффект, который дает *DMXAA* без активации клеток анти *CD* и анти *CD28*. Гибель наивных Т-клеток мышей линии *C57BL/6* через 12 часов была наиболее значимой при добавлении вещества в дозировке 10 мкг/мл, в то время как в 24х часовом интервале достаточно было 5мкг/мл. Концентрации *DMXAA* ниже 5мкг/мл не имели эффекта даже после 24х часов инкубации и достоверно не отличались от показателей, наблюдаемых у *STING*^{-/-} Т-клеток (Рис. 48).

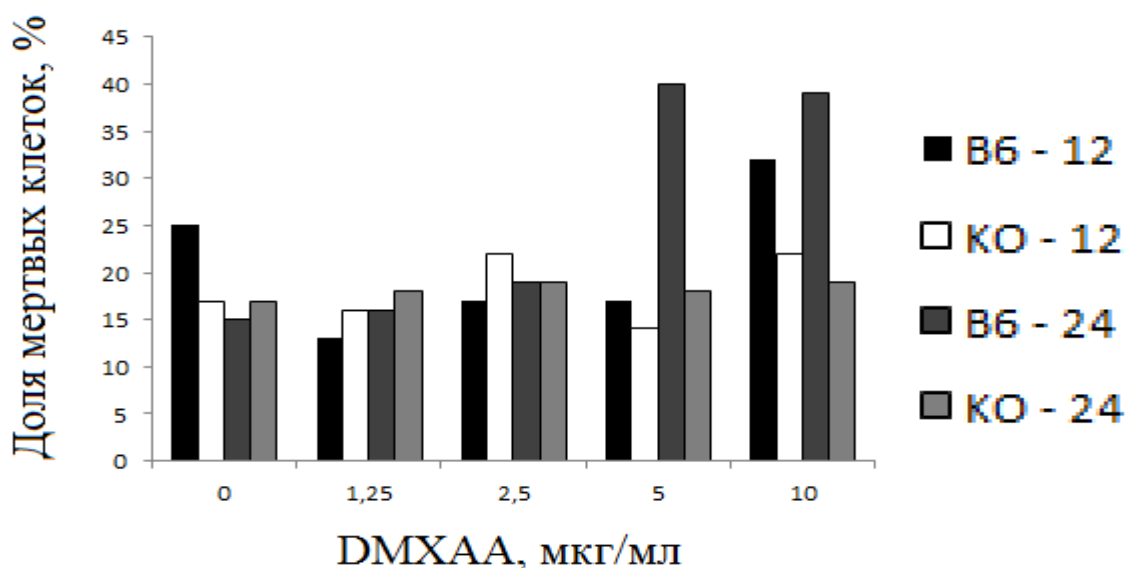


Рис. 48. Выживаемость Т-клеток *STING* дефицитных мышей и нормальных мышей линии *C57BL/6*, которые стимулировались различной дозой *DMXAA*.

При активации STING с помощью DMXAA базовый уровень экспрессии XBP-1 не подвергшегося сплайсингу (XBP-1u) в CD3+ и в STING-дефицитных, не активированных Т-клетках был стабилен при активации ТКР и DMXAA, однако при добавлении только DMXAA у Т-клеток мышей линии C57BL/6 значимо возрастала экспрессия прошедшего сплайсинг XBP-1 (XBP-1s). Соотношение XBP-1s/XBP-1u значительно увеличивалось при активации клеток добавлением анти-CD3 и анти-CD8 у мышей дикого типа (Рис. 49). Кроме того немаловажно и STING-зависимое увеличение экспрессии IFIT2, а также снижение BCL-2 в клетках мышей дикого типа (Рис. 50, 51).

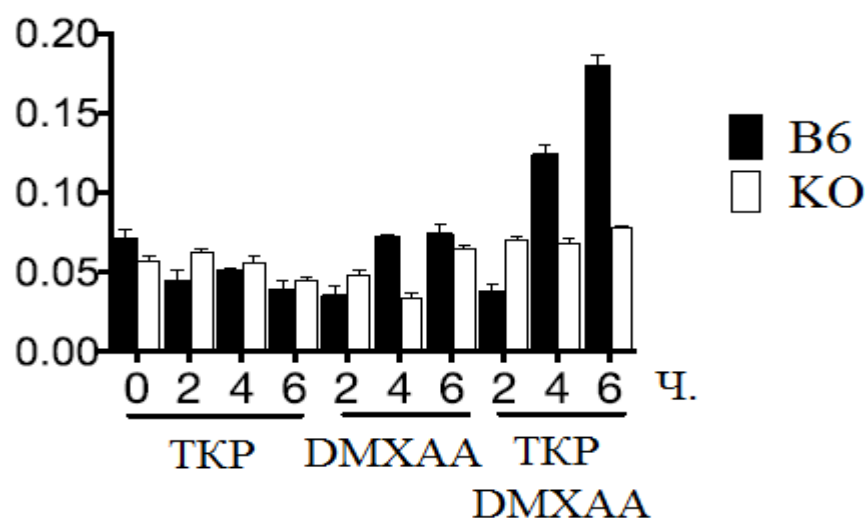


Рис. 49. Соотношение XBP-1s/XBP-1u Т-клеток STING дефицитных мышей и нормальных мышей линии C57BL/6, которые стимулировались DMXAA и анти CD3, анти CD28.

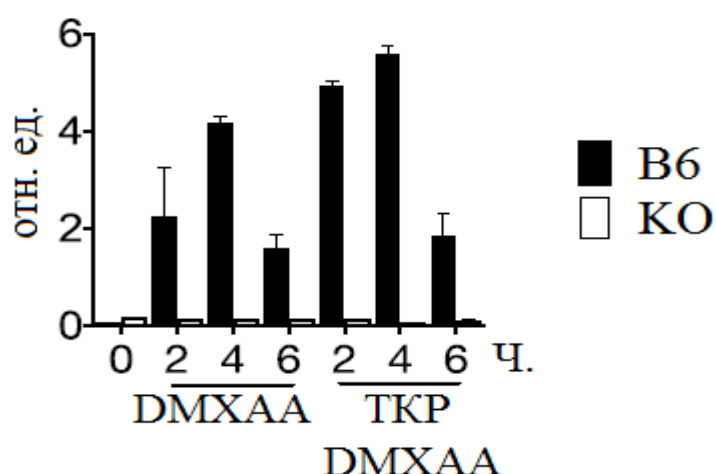


Рис. 50. Уровень экспрессии IFIT2 Т-клеток STING дефицитных мышей и нормальных мышей линии C57BL/6, которые стимулировались DMXAA и анти CD3, анти CD28.

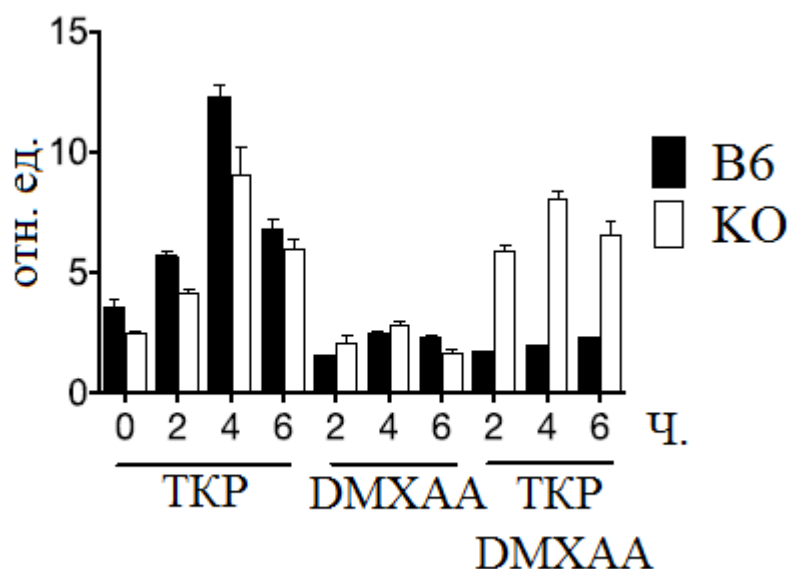


Рис. 51. Уровень экспрессии BCL2 T-клеток STING дефицитных мышей и нормальных мышей линии C57BL/6, которые стимулировались DMXAA и анти CD3, анти CD28.

Несмотря на наличие сцепления смерти T-клеток и ЭПР стресса *in vitro*, при внутривенной инъекции DMXAA мышам отсутствовали изменения в основных показателях смерти T-клеток содержащихся в периферических лимфатических узлах (Рис. 52). Весьма интересно, что при этом наблюдается резкий рост уровня ISGs. Для того, чтобы исключить влияние IFN типа 1 на эти изменения, STING-позитивные CD3+ экспрессирующие CD45.1 T-клетки были перемещены в STING-негативных реципиентов, экспрессирующих CD45.2. После воздействия DMXAA только CD3+ CD45.1+ T-клетки демонстрировали рост экспрессии ISGs (Рис. 53).

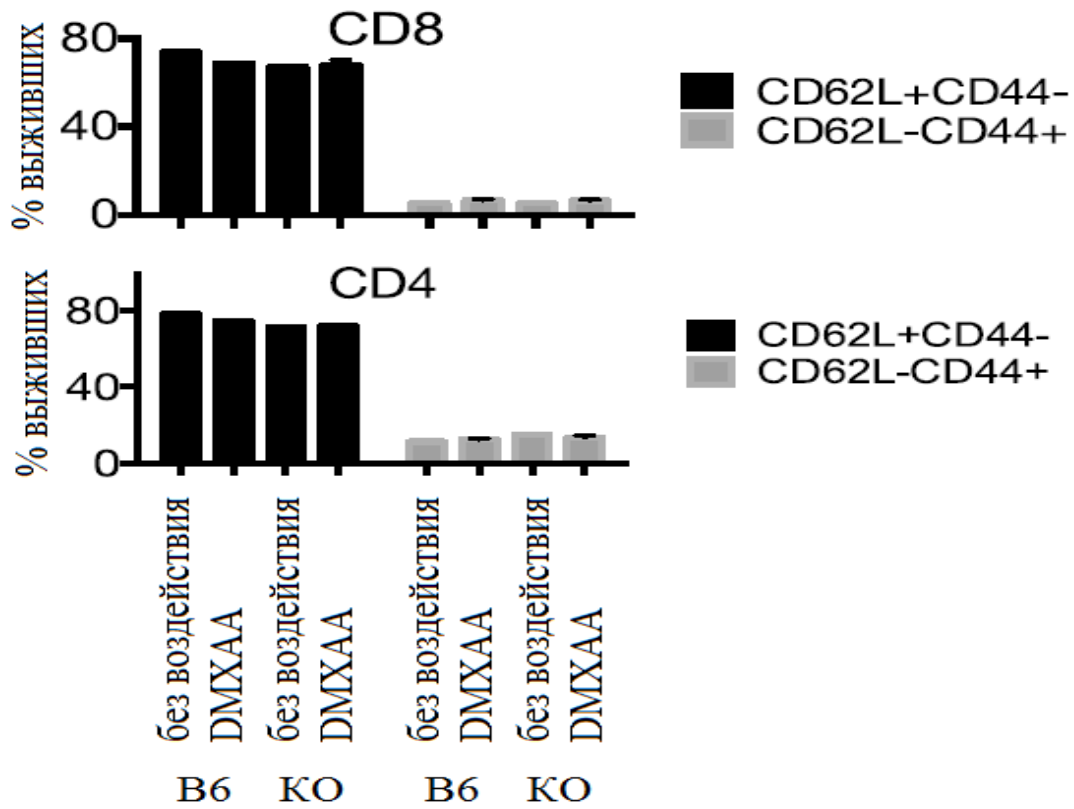


Рис. 52. Выживаемость Т-клеток из периферических лимфатических узлов, которые стимулировались DMXAA у STING дефицитных и нормальных мышей линии C57BL/6.

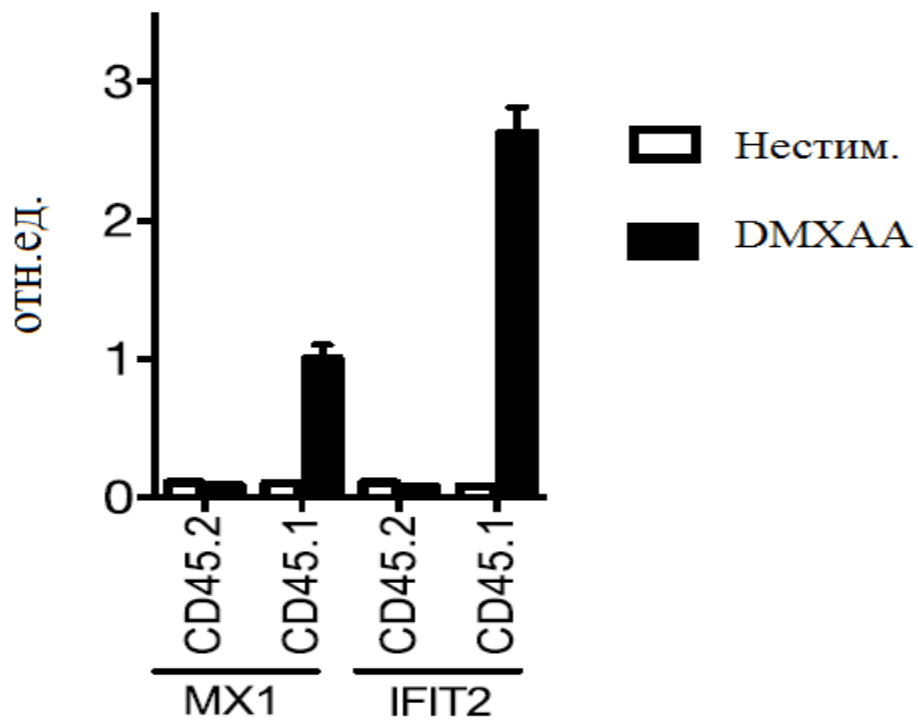


Рис. 53. Уровень экспрессии ISGs у CD45 при воздействии DMXAA на мышей с CD45.2 с донорскими CD45.1.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1 Влияние агонистов Fas/CD95 на клетки, ткани и органы мышей линий MSM и C57BL/6

Программируемая клеточная смерть является чрезвычайно важным процессом на всех этапах существования и развития организма. На сегодняшний день нам достаточно много известно о механизмах активации и особенностях протекания этих процессов, однако огромный пласт информации остается до сих пор неизученным в связи с различными причинами. Использование мышинных линий, чьи предки были разделены географически около 15 тысяч лет тому назад, из-за таяния ледников и образования Японского архипелага (Мещеряков, 2005), позволяет изучать вклад отдельных компонентов в целостный процесс благодаря наличию большого числа полиморфизмов.

Согласно имеющимся данным литературы, мыши MSM устойчивы к ЛПС (Staelens et al., 2002; Mahieu et al., 2006). Реакция на эндотоксин идет по сигнальному пути TNF (Beutler 1986), однако данная линия чувствительна к активации других групп клеточных рецепторов смерти. Так, известный рецептор, связанный с апоптозом, CD95 активируется агонистом Jo2. Мыши MSM оказались нечувствительны к индуцированной Jo2 смерти, а гибриды первого поколения, как и вторая родительская линия C57BL/6 уязвимы для действия вещества (Рис. 1). Литературные данные и выявленный нами уровень АЛТ крови позволили предположить, о наличие поражения печени животных (Tunon et al., 2009).

Данные об активации каспазы 3 (Рис. 5) позволили показать, что поражение печени у мышей линии C57BL/6 обусловлено активацией апоптотических процессов. А поскольку в клетках печени MSM аналогичных явлений не наблюдалось, можно утверждать, что они имеют специфическую устойчивость к апоптозу, обусловленному Jo2. По особенностям запуска апоптотических процессов все клетки условно делят на две группы. Гепатоциты относятся к клеткам второго типа, что означает необходимость синергии митохондриального и CASP8 пути активации апоптоза для успешного его

протекания (Jost et al., 2009; Krammer, Arnold, Lavrik, 2007). Тимоциты относятся к первому типу, и поэтому менее требовательны к условиям активации CD95-зависимого апоптоза. Так, связывание лигандов с CD95 у тимоцитов более эффективно и достаточно для апоптотического сигналинга. В отличие от влияния на клетки печени, Jo2 оказывал существенный цитотоксический эффект на тимоциты как MSM, так и C57BL/6 (Рис. 6). Добавление ингибитора каспаз – zVAD, полностью блокировало влияние Jo2. Это позволяет утверждать, что элиминация клеток шла апоптотическим путем. Аналогичный эффект наблюдался и при добавлении MegaFasL, эти данные позволяют исключить влияние протеина G на полученный результат (Jodo et al., 2000).

Исходя из вышесказанного, можно утверждать, что множественные полиморфизмы мышей MSM в генах, кодирующих CASP8, FADD, RIP1 и, собственно, CD95 не являются причиной устойчивости линии к смерти, индуцированной введением Jo2.

Так как гепатоциты MSM, в отличие от тимоцитов, были устойчивы к Jo2, а в гене, кодирующем CD95, есть полиморфизмы, имеются основания предполагать, что это обусловлено недостаточно сильным связыванием с рецептором, что и обеспечивает выживание мышей этой линии. Проверка устойчивости MSM к MegaFasL, стимулирующему CD95 более эффективно (Рис. 10, 11), показала, что применение лигандов, лучше связывающихся с CD95 в печени MSM, преодолевает устойчивость мышей к апоптозу, гибели организма. Это позволяет утверждать, что мыши MSM имеют более высокий порог активации и лигирования CD95, чем мыши C57BL/6, который преодолевается более сильным агонистом - MegaFasL. Полученные нами данные согласуются с имеющейся информацией о способности MegaFasL преодолевать устойчивость к экзогенному sFLIP в зависимости от дозы (Fricker et al., 2010; Neuman et al., 2010).

Программируемая клеточная смерть обеспечивается за счёт различных сигнальных путей и их компонентов. Одной из важных задач нашего исследования было определить фактор, определяющий различную реакцию мышинных линий на активацию рецептора смерти CD95. Данные, полученные при изучении присутствия компонентов сигнальных путей программируемой клеточной смерти (Рис. 12), позволяют однозначно судить об активации апоптотического сигнального пути и блокировке некроптоза. Весьма интересно, что лигирование CD95 MegaFasL не оказывало особого эффекта на

уровень экспрессии, он практически не менялся относительно уровня покоящихся клеток печени (Рис. 13, верхняя часть). Тем не менее, ткани тимуса MSM и активированной MegaFasL печени MSM находятся на дистальных ветвях кладограммы, что подразумевает большие отличия генетического профиля при ответе на патогены в тканях мышей MSM. Полногеномный анализ всех стимулированных и не стимулированных образцов тканей показал существенные отличия тимуса MSM от других образцов по экспрессионному паттерну. Это наводит на мысль о том, что устойчивость этой линии к апоптозу связана не столько с активацией CD95/Fas опосредованного сигналинга, сколько с процессами прошедшими до его запуска.

4.2 Вклад локуса *cFlar* в устойчивость клеток к программируемой смерти

Количественный анализ сцепления позволил выявить несколько участков генома, способных оказывать влияние на выживаемость мышей при введении им Jo2. Данные секвенирования позволили отсеять участки, не имеющие различия между изучаемыми линиями и остановиться на локусе *cFlar*, имеющем у мышей MSM инсерцию в 21 п.н. Этот фрагмент оказался вовлеченным в альтернативный сплайсинг (Рис. 14). Для формы *cFLIP_R* он является 3'концевым, а для *cFLIP_L* интронным. Данная инсерция отсутствует у мышей линии C57BL/6, но есть у других диких подвидов мышей, таких как MOLF/Ei (*Mus musculus molossinus*), PWK/Ei (*Mus musculus smusculus*), и SPRETUS/Ei (*Mus spretus*). Классические линии, образованные от *Mus musculus domesticus* или линия CAST/Ei (*Mus musculus castaneus*), не имеют этой вставки, что позволяет сделать предположение о формировании данного полиморфизма в процессе разделения мышинных подвидов. Более того, эта вставка обнаружена и у крыс (*Ratus norvegicus*). Важнейшей особенностью данной инсерции является наличие предполагаемого места присоединения U2 snRNP. У мышей линии MSM представлен сайт предполагаемого прикрепления U2AF недалеко от сайта U2. В соответствии с этой информацией закономерно предположить, что мыши MSM присоединяют сплайсосомы более эффективно, чем мыши линии C57BL/6, в контексте вышеописанной информации о данном участке. Это также ведет к более эффективному сплайсингу интронной части между 5-м и 6-м экзонами, и как результат – большему количеству *cFLIP_L* или к проскакиванию 6-го экзона, что приводит к образованию неэффективного транскрипта (Shao et al., 2014). Более легкое присоединение сплайсосомы может приводить и к более

сложной транскрипции cFLIP_R, что влечет за собой, в частности, снижение его удельного количества.

В геноме человека такая вставка из 21 п.н. не представлена. Данные из проекта «1000 Геномов» показывают наличие одиночных нуклеотидных полиморфизмов в 3'некодирующем участке терминального экзона cFLIP_R. Они могут быть альтернативными последовательностями крепления как для U2, так и для U2AF. Интересно, что эти участки находятся весьма близко, что предполагает возможность присоединения сплайсосомы на данном участке. Эта особенность определяет течение сплайсинга, зависящее от представленных вариаций полиморфизма. А так как полиморфизмы, не позволяющие прикрепляться сплайсосоме, представлены в выборке в малом количестве, можно предполагать, что участки ее прикрепления весьма важны для данного фрагмента. Известно, что полиморфизмы интронных последовательностей могут вызывать у людей заболевания, например синдром Райли-Дэя (Carmel et al., 2004). Таким образом, наличие инсерции у мышей MSM может являться моделью для изучения регуляции альтернативного сплайсинга в целом, и cFLIP в частности.

Используя данные секвенирования транскриптома изучаемых мышей, был показан преимущественный сплайсинг длинной формы cFlip, однако немаловажно отметить, что это является специфичным для печени, так как в ткани тимуса подобных различий не наблюдалось.

Для окончательного подтверждения определяющей роли инсерции, находящейся в изучаемом фрагменте генома мышей MSM, в преимущественном сплайсинге длинной формы, был создан конструкт, захватывающий участок с полиморфизмом и фланговые последовательности (Rogaev et al., 2009). Использование такой плазмиды необходимо для исключения влияния сторонних факторов, а так же изучения интенсивности сплайсинга. Полученные данные позволяют однозначно говорить о том, что вставка из 21 п.н. от мышей MSM обеспечивает течение сплайсинга, приводящее к значительному снижению количества транскрипта короткой формы. Таким образом, можно с уверенностью утверждать, что преимущественный сплайсинг длинной формы cFLIP обеспечен инсерцией 21 п.н.

При изучении изоформ каспазы 8 было показано, что содержание p55 и p43 является относительно близким у мышей C57BL/6, а мыши MSM показывают наличие практически исключительно формы p43. Такое смещение между изоформами может

наблюдаться в результате самостоятельного процессинга (Kallenberger et al., 2014) в связи с конститутивной активацией TNF R1, которая происходит при гетеродимеризации CASP8 и cFLIP_L.

Одним из факторов, связанным с процессингом CASP8, являются уровни экспрессии изоформ cFLIP. Так, короткая, если она представлена в большом количестве, связывается с прокаспазой 8 (p55 CASP8), оставляя последнюю интактной, до момента индукции рецептор-зависимой активации. Образованные гетеродимеры даже более стабильны, чем гомодимеры p55, но не могут образовать проапоптотические тетрамеры p10/p18 до лигирования Fas-рецептора. Длинная форма cFLIP также связывается с p55 CASP8, образуя энзиматически активные гетеродимеры, способные обрезать форму CASP8 p55 до p43 (Pop et al., 2011) в процессе конститутивного, «текущего» сигналинга от рецепторов смерти, например TNFR-зависимой олигомеризации (Jiang et al., 1999).

Секвенирование РНК и данные QPCR показали близкие уровни мРНК TNF в печени мышей C57BL/6 и MSM, что позволяет отбросить гипотезу о различном уровне влияния процессинга p55 CASP8 на этапе активации сигналинга. Длинная форма cFLIP не вовлечена в процессинг каспазы 8, однако, является стабилизатором ее формы p43, образуя с ней гетеродимеры. При этом полученные данные определенно позволяют говорить о доминировании длинной формы CFLIP в клетках печени мышей MSM.

Таким образом, относительно высокое содержание длинной формы cFLIP объясняет высокий уровень p43 CASP8, так как гетеродимер CASP8/cFLIP_L энзиматически активен и способен к процессингу каспазы 8, так же, как и компонентов некроптотического пути, в частности RIP1 (Dillon et al., 2012).

Данные эксперимента по специфичности связывания CASP8/cFLIP_L показали наличие такого комплекса в печени мышей MSM. Полученные данные основаны на возможности использования RIP1 в качестве индикатора протеолитической активности гетеродимера p43 CASP8/cFLIP. Это определяется тем, что этот комплекс связан с разрезанием RIP1 в нестимулированных клетках для поддержания их гомеостаза (Micheau et al., 2002). Весьма интересно и то, что регуляторные протеины XIAP и CIAP2 имели сходный уровень у мышей обеих линий, а, значит, не оказывали различающегося влияния на процесс.

Данные о соотношении форм cFLIP в печени не стимулированных мышей показали, что в комплексе с каспазой 8 в печени мышей линии C57BL/6 находятся обе

формы cFLIP, а в печени мышей линии MSM длинная форма белка является доминирующей. Более того, высокие уровни короткой формы RIP1, наблюдаемые в печени мышей MSM, относительно мышей C57BL/6, также указывают на преимущественное формирование комплекса p43 CASP8/ cFLIP_L.

Исследования содержания изоформ белков CFLIP, CASP8 и RIP1 на конгенных мышцах *cFlar msm/msm*, показали соответствие всех показателей родительской линии MSM. В частности, конгенные мыши показывали низкие уровни короткой формы cFLIP, p55 CASP8 и высокие уровни длинной формы cFLIP, если сравнивать с линией C57BL/6. Фрагментация RIP1 также протекала по типу мышей родительской линии MSM. Эти данные дают основания утверждать, что различия в cFLIP, CASP8 и RIP1, обнаруженные в родительских линиях, обусловлены инсерцией в 21 п.н., которая вносит изменения в содержание изоформ cFLIP.

4.3 Влияние STING на синтез интерферонов

Для изучения влияния STING на продукцию интерферонов в Т-клетках необходимо было подобрать подходящий активатор белка и показать его наличие в этой группе клеток, что и было успешно сделано.

DMXAA изначально был описан как противоопухолевый, интерферон-стимулирующий препарат, что позволило использовать его в терапии рака (Roberts, Ching, Vogel, 2008). Позже было показано, что он способен связываться с мышинным, но не с человеческим STING (Conlon et al., 2013), при этом, активируя путь TBK1-IRF3 и индуцируя ответ по пути IFN типа 1.

Так как DMXAA является малой молекулой, и при этом не является цДН, Т-клетки были обработаны тиол-модифицированным цДН, R'S'scGAMP, который способен активировать макрофаги. Воздействие этого соединения на Т-клетки мышей линии C57BL/6 значимо увеличивало уровень экспрессии IFIT2. А в клетках с нокаутированным STING таких различий не наблюдалось (Рис. 27).

При воздействии DMXAA на Т-клетки мышей линии C57BL/6 наблюдался повышенный уровень экспрессии некоторых генов, связанных с регуляцией уровня IFN (IFIT1, IFIT2, MX2). В контрольной группе (отсутствие воздействия) и группах с нокаутированным STING, уровни экспрессии были близки к нулю.

Для того, чтобы липосомальный транспорт веществ не имел влияния на эти показатели, был использован метод электропорации, однако при этом наблюдалась массовая гибель клеток и в отсутствие воздействия R'S'cGAMP. В контексте данных, приведённых выше, DMXAA использовался как активатор STING и в последующих экспериментах, в связи с простотой доставки в клетку.

Кроме увеличения экспрессии ISGs (Рис. 28). Эти данные нетипичны, так как, несмотря на то, что IFN- γ является основным цитокином Т-клеток, IFN типа I не характерен для них.

Таким образом, впервые показано, что активация STING в Т-клетках вызывает ответ IFN типа I.

4.4 Влияние DMXAA на сигнальные пути в Т-клетках

Так же, как и в других клетках (Abe, Barber, 2014), воздействие DMXAA на Т-клетки мышей линии C57BL/6 приводило к фосфорилированию IRF3 и TBK1, чего не наблюдалось в случае нокаута STING. Данных об изменениях в фосфорилировании ингибирующего NFkB белка p105 при активации STING не имеется, но при активации ТКР происходит фосфорилирование p105 и его разрушение до активного транскрипционного фактора p50 (Sriskantharajah et al., 2009), а, значит, можно предположить, что и DMXAA тоже влияет на этот путь сигналинга. Согласно полученным данным содержание pp105 растёт, а содержание p105 и p50 при этом остаётся неизменным. К этому следует добавить, что конституитивный процессинг p105 может оказывать скрывающий эффект на определяемое количество p50, даже когда он транскрипционно активен.

В ходе исследования было установлено, что в отличие от макрофагов, аутокринный IFN не имеет влияния на сигналинг STING в Т-клетках, так как Т-клетки мышей, дефицитных по рецептору IFN типа 1, не отличались от нормальных мышей. Таким образом, при том, что активация STING в Т-клетках приводит к активации многих сигнальных путей, обнаруженных в клетках врожденного иммунного ответа, весьма вероятно наличие уникальных особенностей, которые могут выразиться в специфических реакциях Т-клеток.

Функции и роль PRR в Т-клетках являются объектом споров и активного изучения в течение многих лет. Есть данные о том, что в Т-клетках встречаются

различные PRR, способные к проведению костимулирующих сигналов (MacLeod, Wetzler, 2007; Reynolds, Dong, 2013).

В ходе эксперимента было изучено влияние лигандов TLR на Т-клетки, так как для этого, как правило, требуется наличие предварительной или сочетанной стимуляции (Gelman et al., 2004; Caron et al., 2005). В результате было обнаружено, что DMXAA усиливает STING зависимое фосфорилирование p-TBK1 и p-IRF3, а остальные элементы, связанные с MAPK и NFkB, перекрываются с явно аддитивным и, возможно, синергичным эффектом, что позволяет судить о наличии сочетанного влияния костимуляции STING и TLR. Кроме того, было показано наличие функционирующего сигналинга, низлежащего к ТКР в клетках STING^{-/-}, и не подвергающегося аддитивному эффекту при совокупной активации ТКР с DMXAA.

STING дефицитные и нормальные клетки мышей C57BL/6 демонстрируют сходные уровни p-ERK и p-p65 при стимуляции ТКР, что позволяет предположить отсутствие влияния STING на данные процессы. Инфекции *in vivo* и исследования иммунизации описывают отличающийся ответ в таких клетках, что относят к влиянию АПК и их взаимодействию с Т-клетками (Archer, Durack, Portnoy, 2014).

Данные о субпопуляциях Т-клеток нормальных и деффектных по STING мышей в совокупности с информацией об отсутствии разницы в ТКР сигналинге, позволяют предполагать, что Т-клетки мышей C57BL/6 в норме и мышей со STING^{-/-} функционально эквивалентны, однако клетки с нокаутным STING показывают более высокое содержание CD25 при активации смесью с присутствием DMXAA (Murphy, Weaver, 2016).

Данные, полученные при проверке влияния DMXAA на их активацию и пролиферацию при стимуляции ТКР, показывают снижение экспрессии CD25, что предположительно связано с клеточной смертью, индуцированной DMXAA. Кроме того, исходя из результатов, показанных при изучении IFNAR^{-/-} мышей, можно опровергнуть любое влияние аутокринного IFN типа I на этот процесс при том, что IFN типа I способен активировать сигнальные пути, ведущие к синтезу IL-10 (Rep et al., 1996).

Все вышесказанное, в совокупности с данными о пролиферации Т-клеток при стимуляции ТКР и STING разделенной по времени (Рис. 41), позволяет предполагать,

что DMXAA не влияет на раннюю активацию Т-клеток, но способен инициировать STING-зависимый антипролиферативный сигналинг.

Полученные результаты секвенирования и RT-PCR наивных C57BL/6 и STING дефицитных CD3+ клеток показали, что DMXAA в чистом виде усиливает экспрессию группы ISGs у нормальных мышей, а у дефицитных по STING такого влияния не наблюдается (Рис. 42). Особенное внимание привлекает сильная ап-регуляция целой группы генов интерферонов. Добавление стимуляторов ТКР совместно с DMXAA усиливало экспрессию ISGs, что укрепляет предположения о синергии искомых путей.

Анализ полученных данных на участие в сигнальных путях показал STING-зависимый скачок в путях апоптоза и каспазного каскада, а также снижение экспрессии IL-2 и генов клеточного цикла. Особенно примечательно то, что ни один из этих путей сигналинга, приводящих к смерти, не активируется с помощью DMXAA в макрофагах. Сравнение активации путей сигналинга показало значительные различия между макрофагами и STING дефицитными Т-клетками.

В связи с тем, что летальность, индуцированная цДН в клетках врожденного иммунитета, не наблюдалась, трудно было бы ожидать роста экспрессии проапоптотических генов в макрофагах. Возможно, это явление связано с тем, что клетки врожденного иммунитета должны переживать угрозы, активирующие STING для инициации дальнейшего иммунного ответа, а в случае детекции STING вирусной инфекции или повреждения внутренней ДНК в Т-клетке, для хозяина предпочтительнее ее элиминация.

Также STING индуцированная клеточная смерть может объяснить и блокировку пролиферации Т-клеток мышей C57BL/6, в связи со снижением экспрессии генов клеточного цикла и путей сигналинга IL-2 в ответ на DMXAA (Рис. 43). При этом основная функция IL-2 связана с распространением и развитием Т-клеток.

Анализ сигнальных путей неожиданно показал, что гены UPR, в частности Bip/HSPA5 и GADD, были сильно апрегулированы, как и ISGs (Рис. 44). Нарастание в ЭПР концентрации белков, не прошедших фолдинг, или тех, в которых он прошел неправильно, приводит к стрессу ЭПР и блокировке трансляции белка, что способствует гибели клетки. Активация UPR решает проблемы, приводящие к этому типу стресса, и предотвращает смерть клетки, повышая емкость ЭПР для фолдинга (Szegezdi et al., 2006; Tabas, Ron, 2011). Стимуляция ТКР в чистом виде способна индуцировать UPR, так как

активированные клетки наращивают синтез для нужд пролиферации. В то же время сигналинг ТКР индуцирует выброс Ca^{2+} и его перемещения в ЭПР, а, как известно, этот ион может взаимодействовать с процессом фолдинга белков и вызывать UPR. Обусловленная активацией транслокация STING из мембраны ЭПР может приводить к дальнейшим изменениям баланса ионов кальция, что даст слишком высокую нагрузку на процесс UPR и приведет к стрессу и как результат – клеточной смерти.

4.5 Взаимосвязь клеточной смерти с активацией STING в Т-клетках

Основываясь на данных, полученных в результате сиквенса РНК, было выдвинуто предположения, что DMXAA может активировать проапоптотический сигналинг STING-опосредованно и, возможно, индуцируя судьбоносный для клетки UPR. Однако полученные данные позволяют предполагать, что апоптотический путь смерти Т-клеток, инициированный DMXAA, при необходимости может заменяться на некроптотический. Так же было выяснено, что без стимуляции ТКР концентрация DMXAA ниже 5 мкг/мл не приводит к смерти Т-клеток.

Следующим этапом исследования была проверка на наличие взаимосвязи клеточной смерти со STING и UPR. В связи с данными о том, что в макрофагах активация UPR, которая происходит при стимуляции PRR, требует активации XBP-1 путем нетрадиционного сплайсинга (Smith et al., 2008), было решено протестировать Т-клетки на наличие такой же реакции при активации STING с помощью DMXAA. При этом наблюдалось увеличение экспрессии ISGs и снижение экспрессии анти-апоптотических генов, что весьма важно и соответствует данным, полученным при РНК-сиквенсе. Таким образом, совокупность полученных данных позволяет проследить связь между активацией STING в Т-клетках, индукцией UPR и последующей клеточной смертью, возможно в связи с провалом борьбы с ЭПР-стрессом.

Отсутствие элиминации Т-клеток в построенной *in vivo* модели может являться дозозависимым, так как концентрация DMXAA, влияющего на Т-клетки, ниже, чем в экспериментах *in vitro*. Другой причиной может быть влияние окружающих клеточных популяций, которое невозможно учесть в эксперименте *in vitro*.

Суммируя вышеизложенный материал, можно смело говорить наличии влияния белковых продуктов генов *cFlag* и *Tmem173* на механизмы, определяющие программируемую клеточную смерть. Возможность активации Т-клеток

синтетическими агонистами STING раскрывает огромный потенциал использования этого явления в медицине. Полученные данные в целом являются важным фундаментальным компонентом для понимания механизмов и стратегий биохимических адаптаций к разнообразным условиям среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные, представленные выше, проливают свет на ранее не выясненную роль cFLIP в регуляции сигналинга, идущего от рецепторов смерти. В частности, показано, что устойчивость к CD95-зависимой смертности у мышей линии MSM обусловлена относительно высокими уровнями cFLIP_L и низкими cFLIP_R в печени этих животных. Также идентифицирована вставка в 21 п.н. в 5-м экзоне гена *cFlar* у этой линии мышей. Эта вставка соответствует 3'UTR мРНК короткой формы FLIP и может предотвращать ее транскрипцию, в итоге, приводя к альтернативному сплайсингу и, таким образом, увеличивая транскрипцию и трансляцию длинной формы FLIP. В отсутствие короткой формы белка, длинная изоформа FLIP стабилизирует CASP8 и формирует энзиматически активный гетеродимер, который способен путем аутопротеолиза переходить из формы p55-CASP8 в p43-CASP8. Этот гетеродимер FLIPL/p43-CASP8 также способен к протеолизу длинной формы RIP1, что, в результате, создает микроокружение, одновременно ингибирующее и апоптоз, и некроптоз. Практически полный протеолиз RIP1 и формирование p43-CASP8 у мышей MSM позволяет предполагать, что компоненты DISK подготовлены, несмотря на отсутствие активации. Одним из условий, обеспечивающих процессинг CASP8 в p43-CASP8, может быть конститутивная активация сигналинга TNF рецептора из-за текущего слабого сигналинга. Однако ни qPCR, ни РНКовый секвенсы не выявили значительных различий в TNF мРНК между линиями мышей, что могло бы объяснить преимущественный процессинг CASP8 у линии MSM.

Идентификация инсерции в 21 п.н. в мРНК FLIP линии MSM оказалась возможна благодаря генетическому анализу устойчивости летальности зависимой от рецептора смерти *in vivo*. Используя смерть как фенотипический признак, было определено несколько локусов, показывающих высокое сцепление. Наибольшее значение было у точки на хромосоме 1. Полученные данные были совмещены с данными полногеномного РНК секвенса и анализа сигнальных путей. Основываясь на этих данных для множества тканей, было выявлено, что инсерция в 21 п.н. взаимодействует

с белками сплайсинга тканеспецифично. Она влияет на сплайсинг только в печени мышей линии MSM, что и объясняет устойчивость этой ткани к апоптозу, в то время как клетки в тимусе остаются чувствительными. То, что данная инсерция не влияет на другие ткани MSM, может объясняться различным микроокружением.

Модель устойчивости к апоптозу, на основании данных полученных по линии MSM, относится к одной из догм в данной области. Слабый сигнал коррелирует со смертью у клеток первого типа, а сильный со смертью у клеток второго типа, что ожидаемо. В частности, некоторые компоненты сигнального каскада могут отсутствовать или быть представленными в небольшом количестве, например, полноразмерная CASP8 как компонент DISK. В мышах линии MSM она представлена в виде гетеродимера CASP8/ cFLIP_L в связи с высоким содержанием cFLIP_L и более высоким сродством CASP8 к cFLIP_L, чем к самой себе. Образующийся гетеродимер энзиматически активен, и способен к протеолитическому формированию p43/CASP8, которая, в отличие от формы p10/18-CASP8, не активирует CASP3, и, как результат, предотвращает апоптоз.

В итоге следует отметить, что эта, ранее не охарактеризованная модель устойчивости к Fas-индуцированной смерти *in vivo*, вероятно, первая, позволяющая провести различие между индуцирующими смерть лигандами. Так, можно ожидать, что в других диких линиях, таких как MOLF и PWK, имеющих аналогичную инсерцию в *cFlar*, сохранится фенотип устойчивости, так как у конгенных мышей N5F3 *cFlar^{msm/msm}* сохраняется биохимия апоптотического комплекса, наблюдаемого у родительской линии MSM. В свою очередь, мыши другой линии дикого типа SPRETUS, устойчивы к TNF-индуцированной смерти, однако эта устойчивость картируется уже к другому локусу.

Функции и роль PRR в Т-клетках являются объектом споров и активного изучения в течение многих лет. Есть данные о том, что в Т-клетках встречаются различные PRR, способные к проведению сигналов. ТКР-независимая, цитозольная ДНК-рецепция является уникальным инструментом контроля за инфекцией и повреждениями ДНК в Т-клетках и способна активировать саморазрушение клетки, что не позволяет инфицированным, поврежденным или потенциально канцерогенным клеткам вызвать болезнь всего организма.

В результате проделанных исследований, связанных с локусом, кодирующим STING, можно сделать два весьма важных заключения. Во-первых, по аналогии с клетками врожденного иммунитета, в Т-клетках сигнальный путь STING индуцирует ответ IFN типа I. Это является весомым дополнением к тем фактам, что PRR функционируют в Т-клетках, однако активация ТКР приводит к ответу, не являющемуся взаимозависимым от STING агонистов. Во-вторых, была показана STING-зависимая индукция UPR и элиминация Т-клеток, что ранее не было описано для клеток миелоидного ряда.

Вышеизложенные данные прекрасно согласуются с литературными данными, демонстрирующими цДН-индуцированный апоптоз в В-клетках и В-клеточных лимфомах. Кроме того, в ходе работы впервые показано с помощью DMXAA и R'ScGAMP, что Т-клетки чувствительны к активации STING. Кроме всего прочего, причины, по которым активация Т-клеток *in vitro* приводит к их смерти, а *in vivo* приводит к ответу IFN типа I, требуют дополнительного изучения.

Проведенные исследования показывают, что очень внимательное изучение эффектов, оказываемых агонистами STING на Т-клетки, необходимо в случае их предполагаемого использования в роли терапевтических средств. В частности, усиление продукции IFN типа I в Т-клетках в ответ на агонисты STING, особенно когда Т-клетки с химерными рецепторами пересажены пациенту, может значительно усилить противоопухолевую реакцию организма. Кроме того, использование аналога DMXAA, как адьюванта вакцины, может быть исключительно полезным, когда желательно получить интерфероновый ответ. При всем этом долгосрочные эффекты активации STING не изучены. Согласно данным литературы, элиминация клеток В-клеточной лимфомы в ответ на cGAMP наблюдалась через несколько недель после введения вещества, а это значит, что через аналогичный промежуток времени реакции Т-клеточного стресса и смерти могут быть близки к результатам эксперимента *in vitro*, в отличие от наблюдаемого интерферонового ответа в коротком эксперименте.

ВЫВОДЫ

1. Анализ сцепления в поколении F2 от интеркросса C57BL/6 x MSM выявил несколько локусов MSM, контролирующих устойчивость к Fas-опосредованной клеточной смерти, включая локусы гена каспазы 8 и FADD-подобного регулятора апоптоза *cFlar*, кодирующего cFLIP. С помощью QTL-анализа сцепления установлена связь между выживанием и соответствующими геномными локусами на панели F2 мышей. 2D-анализ, определяющий наследование генных локусов, расположенных на разных хромосомах, идентифицировал локусы на хромосомах 1 и 7. Геномная область на хромосоме 1 была проксимальна как для гена каспазы 8, так и для гена cFLIP.
2. Устойчивость к программированной клеточной смерти, опосредованной рецептором Fas/CD95, у мышей линий C57BL/6 и MSM обусловлена соотношением сплайс-изоформ cFLIP_L и cFLIP_R в печени: клетки печени MSM преимущественно экспрессируют вариант cFLIP_L, в отличие от клеток печени C57BL/6, которые имеют более высокие уровни cFLIP_R. В печени MSM каспаза 8 присутствует исключительно в виде расщепленного продукта p43, связанного с cFLIP_L и предотвращающего ее расщепление до p10/20, который, в свою очередь, необходим для активации каспазы 3 и запуска Fas/CD95-индуцированной клеточной смерти.
3. В области пятого экзона гена *cFlar* идентифицирована инсерция в 21 п.н., влияющая на дифференциальный сплайсинг мРНК cFLIP. Данная область является 3'-UTR для cFLIP_R и интронной областью для cFLIP_L, обуславливает высокое содержание изоформы cFLIP_L в печени мышей линии MSM за счет преимущественного образования мРНК cFLIP_L путем альтернативного сплайсинга. Инсерция отсутствует у мышей C57BL/6, но сохраняется в других штаммах дикого типа.
4. Стимуляция синтетическим STING-агонистом DMXAA *Tmem173*/STING Т-клеток мышей линии C57BL/6 приводит к выработке нехарактерного для них IFN типа I

(IFN- β) и индукции экспрессии интерферон-стимулирующих генов (ISGs), аналогично ответу макрофагов и дендритных клеток, что указывает на функционирование в Т-клетках паттернраспознающих рецепторов.

5. Активация сигнальных путей в ответ на стимуляцию синтетическим STING-агонистом DMXAA *Tmem173*/STING в Т-клетках мышей линии C57BL/6 приводит к индукции клеточного стресса и программируемой клеточной смерти (апоптозу), которые обусловлены реакцией на несвернутые белки (UPR-реакцией) и накопление их в ЭПР.

Список сокращений

3'-UTR - 3'-нетранслируемая область (от англ. 3'-untranslated region),

AIF – апоптоз индуцирующий фактор (от англ. apoptosis inducing factor)

APAF1 – фактор активирующий апоптотические протеазы 1 (от англ. apoptotic protease activating factor 1),

APC – антиген представляющие клетки (от англ. antigen-presenting cell),

ASK1 – киназа регулирующая апоптотический сигнал 1 (от англ. Apoptosis signal-regulating kinase 1),

ATF6 – фактор активации транскрипции 6 (от англ. Activating transcription factor 6),

BCL – белок регулятор апоптоза В-клеточной лимфомы (от англ. B-cell lymphoma 2),

BCLXL – продукт гена В-клеточной лимфомы XL (от англ. B-cell lymphoma-extra-large),

ВКР – В-клеточные рецепторы,

Vim - Bcl-2 подобный белок (от англ. Bcl-2-like protein 11),

BiP – связывающий иммуноглобулин белок (от англ. Binding immunoglobulin protein),

CARMA1 – содержащая домен активации каспаз, мембрано-ассоциированная гуанилат киназа 1 (от англ. Caspase recruitment domain-containing membrane-associated guanylate kinase protein-1),

CASP8 – каспаза 8 (от англ. Caspase-8),

CCL18 – СС хемокиновый лиганд 18 (от англ. CC chemokine ligand 18),

CD## - кластер дифференцировки (от англ. cluster of differentiation)

cFlar – Каспаза 8 и FADD подобный регулятор апоптоза (от англ. Caspase 8 And FADD Like Apoptosis Regulator),

cFLIP - CASP8 и FADD-подобный регулятор апоптоза (от англ. CASP8 and FADD-like apoptosis regulator),

CFSE - сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина (от англ. Carboxyfluorescein succinimidyl ester),

cGAS – цикло-АМФ-ГМФ синтаза (от англ, cyclic GMP-AMP synthase),

CHOP – транскрипционный фактор ССААТ последовательности (от англ. ССААТ-enhancer-binding protein homologous protein),

CRAC – каналы активируемые высвобождением кальция (от англ. Calcium release-activated channels),

DAG – диацилглицерол (от англ. Diacylglycerol),

DC – дендритные клетки (от англ. Dendritic cells),

DIABLO – белок напрямую связывающийся с IAP (от англ. direct IAP binding protein with low pI),

DISC – индуцирующий смерть сигнальный комплекс (от англ, death-inducing signaling complex),

DMХАА–5,6-диметилксантенон-4-уксусная кислота,

ERK – киназа регулируемая внеклеточным сигналом (от англ. extracellular signal-regulated kinases),

FADD – FAS ассоциированный белок с доменом смерти(от англ. Fas-associated protein with death domain),

FAS – фактор апоптотического семейства(от англ. factor apoptosis superfamily),

FasL – лиганд к FAS,

GADD34 –белок индуцибельный ограничением роста и повреждением ДНК (от англ. growth arrest and DNA damage-inducible protein),

GMP – гуанозин монофосфат (от англ. guanosine monophosphate),

GAMP – гуанозин-аденозин монофосфат (от англ. guanosine-adenosine monophosphate),

IAP – белок ингибитор апоптоза (от англ. inhibitors of apoptosis),

IFI16 – гамма-интерферон-индуцибельный протеин 16 (от англ. gamma-interferon-inducible protein),

IFN – интерферон (от англ. Interferon),

IFNAR – интерферон- α/β рецептор (от англ. The interferon- α/β receptor),

IKK - ИкВ киназа (от англ. ИкВ kinase),

IL – интерлейкин (от англ. Interleukin),

IRE1 – инозитол-требующий белок 1 (от англ. Inositol-requiring enzyme 1),

IRF3 - регуляторный фактор интерферона 3 (от англ. Interferon regulatory factor 3),

ISGs – интерферонстимулирующие гены (от англ. Interferon stimulating genes),

ITAM - активационный тирозинсодержащий мотив иммунорецепторов (от англ. An immunoreceptor tyrosine-based activation motif),

JNK - c-Jun N-концевая киназа (от англ. c-Jun N-terminal kinases),

Jo2 – моноклональные антитела, агонисты FASR (по авт. J.Ogasawara),

LAT – линкер для активации Т-клеток (от англ. linker for activation of T cells),

LCMV – вирус лейкоцитарного хореоменингита (от англ. Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus),

LPS – липополисахарид (от англ. Lipopolysaccharide),

МАРК - митоген-активируемая протеинкиназа (от англ. mitogen-activated protein kinase),

MEF – мышинные эмбриональные фибробласты (от англ. mouse embryonic fibroblasts),

MegaFasL, mFasL – многомерный Fas-лиганд (от англ. Multimetric Fas-Ligand),

МНС – главный комплекс гистосовместимости (от англ. major histocompatibility complex),

MLKL – псевдокиназа доменоподобного белка киназы смешанной линии (от англ. mixed lineage kinase domain like pseudokinase),

MyD88 - цитозольный адаптерный белок (от англ. Myeloid differentiation primary response gene (88)),

NFAT – ядерный фактор активации Т-клеток (от англ. Nuclear factor of activated T-cells),

NFκB - ядерный фактор «каппа-би» (от англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells),

PERK – протеинкиназо-R-подобная ЭПР киназа (от англ. protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase),

PRR – патоген распознающие рецепторы (от англ. Pathogen recognition receptors),

RIP1(3) - взаимодействующая с рецептором серин / треонин-протеинкиназа (от англ. receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1(3)),

SLP76 – лимфоцитарный цитозольный протеин (от англ. SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa),

STIM1 – молекула стромального взаимодействия (от англ. Stromal interaction molecule 1),

STING – стимулятор интерфероновых генов (от англ. Stimulator of interferon genes),

ТВК1 – серин-треониновая протеин киназа 1 (от англ. TANK-binding kinase 1),

TLR – толл-подобные рецепторы (от англ. Toll-like receptor),

TNF – фактор некроза опухоли (от англ. tumor necrosis factor),

TOSO – молекула ингибирующая FAS зависимый апоптоз,

ULK1 – Unc-51 подобная киназа активирующая аутофагию (от англ. Unc-51 like autophagy activating kinase),

UPR – ответ на белки не прошедшие фолдинг (от англ. unfolded protein response),

ХВР1 – белок связывающийся с Х боксом (от англ. X-box binding protein 1),

zVAD - N-бензилоксикарбонил-Val-Ala-Asp(O-Me) флюорометил кетон,

АЛТ – аланинаминотрансфераза,

АТФ – аденозинтрифосфат,

АФК - активные формы кислорода,

ВИЧ - вирус иммунодефицита человека,

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота,

ЕКК – естественные киллеры,

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота,

п.н. – пар нуклеотидов,

ТКР – Т-клеточный рецептор,

цДН – циклический динуклеотид,

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты,

ЭПР – эндоплазматический ретикулум,

Список литературы

1. Барышников А. Ю., Шишкин Ю. В. Иммунологические проблемы апоптоза. — М.: Эдиториал УРСС, 2002. — 320 с.
2. Гордеева А. В., Лабас Ю. А., Звягильская Р. А. Апоптоз одноклеточных организмов: механизмы и эволюция. Обзор // Биохимия.— 2004.— Т. 69.— №. 10.— С. 1301-1313.
3. Коросов А.В., Горбач В.В. Компьютерная обработка биологических данных.— Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2010.— 84 с.
4. Манских В. Н. Пути гибели клетки и их биологическое значение // Цитология.— 2007.— Т. 49.— №. 11.— С. 909-915.
5. Мещеряков А. Н. История Японского архипелага как социоестественный и информационный процесс // История и современность.— 2005.— №. 1.
6. Сербин М. Е., Щербак Е. В. Апоптоз и его молекулярные эффекторы // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии. Томск: Сибирский государственный медицинский университет.— 2004.— №. 1.
7. Ярилин А. А. Апоптоз и его роль в целостном организме // Глаукома. — 2003. — Т. 2. — С. 46-54.
8. Abe T. et al. STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense // Molecular cell.— 2013.— Т. 50.— №. 1.— С. 5-15. ЗДЕсь и далее: д.б. Р. 5-15/
9. Abe T., Barber G. N. Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF-κB activation through TBK1 // Journal of virology.— 2014.— Т. 88.— №. 10.— С. 5328-5341.
10. Abe T., Barber G. N. Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF-κB activation through TBK1 // Journal of virology.— 2014.— Т. 88.— №. 10.— С. 5328-5341.
11. Adema G. J. et al. A dendritic-cell-derived C–C chemokine that preferentially attracts naive T cells // Nature.— 1997.— Т. 387.— №. 6634.— С. 713.
12. Agarwal P. et al. Gene regulation and chromatin remodeling by IL-12 and type I IFN in programming for CD8 T cell effector function and memory // The Journal of Immunology.— 2009.— Т. 183.— №. 3.— С. 1695-1704.

13. Ahn J. et al. Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING // *Nature communications*.– 2014.– T. 5.– C. 5166.
14. Ahn J. et al. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease // *Proceedings of the National Academy of Sciences*.– 2012.– T. 109.– №. 47.– C. 19386-19391.
15. Almine J. F. et al. IFI16 and cGAS cooperate in the activation of STING during DNA sensing in human keratinocytes // *Nature communications*. – 2017. – T. 8. – C. 14392.
16. Archer K. A., Durack J., Portnoy D. A. STING-dependent type I IFN production inhibits cell-mediated immunity to *Listeria monocytogenes* // *PLoS pathogens*.– 2014.– T. 10.– №. 1.– C. e1003861.
17. Archer K. A., Durack J., Portnoy D. A. STING-dependent type I IFN production inhibits cell-mediated immunity to *Listeria monocytogenes* // *PLoS pathogens*.– 2014.– T. 10.– №. 1.– C. e1003861.
18. Axtell R. C., Raman C., Steinman L. Type I interferons: beneficial in Th1 and detrimental in Th17 autoimmunity // *Clinical reviews in allergy & immunology*.– 2013.– T. 44.– №. 2.– C. 114-120.
19. Barry M., Bleackley R. C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death // *Nature Reviews Immunology*.– 2002.– T. 2.– №. 6.– C. 401.
20. Berg R. K. et al. T cells detect intracellular DNA but fail to induce type I IFN responses: implications for restriction of HIV replication // *PLoS One*.– 2014.– T. 9.– №. 1.– C. e84513.
21. Bernales S., McDonald K. L., Walter P. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response // *PLoS biology*.– 2006.– T. 4.– №. 12.– C. e423.
22. Beutler B. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance // *Science*.– 1986.– T. 232.– C. 977-981.
23. Bortner C. D., Oldenburg N. B. E., Cidlowski J. A. The role of DNA fragmentation in apoptosis // *Trends in cell biology*.– 1995.– T. 5.– №. 1.– C. 21-26.
24. Bouillet P. et al. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity // *Science*.– 1999.– T. 286.– №. 5445.– C. 1735-1738.
25. Brownlie R. J., Zamoyska R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded // *Nature Reviews Immunology*.– 2013.– T. 13.– №. 4.– C.257.

26. Brush M. H., Weiser D. C., Shenolikar S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 α to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 // *Molecular and cellular biology*.– 2003.– T. 23.– №. 4.– C. 1292-1303.
27. Burdette D. L. et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP // *Nature*.– 2011.– T. 478.– №. 7370.– C. 515.
28. Buzdin A. A. et al. Oncofinder, a new method for the analysis of intracellular signaling pathway activation using transcriptomic data // *Frontiers in genetics*.– 2014.– T. 5.– C. 55.
29. Calfon M. et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA // *Nature*.– 2002.– T. 415.– №. 6867.– C. 92.
30. Caramalho I. et al. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide // *Journal of Experimental Medicine*.– 2003.– T. 197.– №. 4.– C. 403-411.
31. CARMEL I. D. O. et al. Comparative analysis detects dependencies among the 5' splice-site positions // *Rna*.– 2004.– T. 10.– №. 5.– C. 828-840.
32. Caron G. et al. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN- γ production by memory CD4⁺ T cells // *The Journal of Immunology*.– 2005.– T. 175.– №. 3.– C. 1551-1557.
33. Caron G. et al. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN- γ production by memory CD4⁺ T cells // *The Journal of Immunology*.– 2005.– T. 175.– №. 3.– C. 1551-1557.
34. Carrero J. A., Calderon B., Unanue E. R. Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to *Listeria* infection // *Journal of Experimental Medicine*.– 2004.– T. 200.– №. 4.– C. 535-540.
35. Case C. L. et al. Caspase-11 stimulates rapid flagellin-independent pyroptosis in response to *Legionella pneumophila* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*.– 2013.– T. 110.– №. 5.– C. 1851-1856.
36. Chen G. G., Lai P. B. S. Apoptosis in carcinogenesis and chemotherapy.– Dordrecht, The Netherlands : Springer, 2009.
37. Cheshenko N. et al. Herpes simplex virus triggers activation of calcium-signaling pathways // *J Cell Biol*.– 2003.– T. 163.– №. 2.– C. 283-293.

38. Chinnaiyan A. M. et al. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis // *Cell*.– 1995.– T. 81.– №. 4.– C. 505-512.
39. Cho Y. S. et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation // *Cell*.– 2009.– T. 137.– №. 6.– C. 1112-1123.
40. Cohen G. M. Caspases: the executioners of apoptosis // *Biochemical Journal*.– 1997.– T. 326.– №. Pt 1.– C. 1.
41. Conlon J. et al. Mouse, but not human STING, binds and signals in response to the vascular disrupting agent 5, 6-dimethylxanthenone-4-acetic acid // *The Journal of Immunology*.– 2013.– T. 190.– №. 10.– C. 5216-5225.
42. Conlon J. et al. Mouse, but not human STING, binds and signals in response to the vascular disrupting agent 5, 6-dimethylxanthenone-4-acetic acid // *The Journal of Immunology*.– 2013.– T. 190.– №. 10.– C. 5216-5225.
43. Corrales L. et al. Direct activation of STING in the tumor microenvironment leads to potent and systemic tumor regression and immunity // *Cell reports*.– 2015.– T. 11.– №. 7.– C. 1018-1030.
44. de Almeida L. A. et al. MyD88 and STING signaling pathways are required for IRF3-mediated IFN- β induction in response to *Brucella abortus* infection // *PloS one*.– 2011.– T. 6.– №. 8.– C. e23135.
45. Degterev A. et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury // *Nature chemical biology*.– 2005.– T. 1.– №. 2.– C. 112.
46. Degterev A. et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins // *Nature chemical biology*.– 2008.– T. 4.– №. 5.– C. 313.
47. Dhanasekaran D. N., Reddy E. P. JNK-signaling: a multiplexing hub in programmed cell death // *Genes & cancer*. – 2017. – T. 8. – №. 9-10. – C. 682.
48. Dillon C. P. et al. RIPK1 blocks early postnatal lethality mediated by caspase-8 and RIPK3 // *Cell*. – 2014. – T. 157. – №. 5. – C. 1189-1202.
49. Dillon C. P. et al. Survival function of the FADD-CASPASE-8-cFLIP L complex // *Cell reports*.– 2012.– T. 1.– №. 5.– C. 401-407.
50. Dillon C. P. et al. Survival function of the FADD-CASPASE-8-cFLIP L complex // *Cell reports*. – 2012. – T. 1. – №. 5. – C. 401-407.

51. Diner E. J. et al. The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING // *Cell reports.*– 2013.– T. 3.– №. 5.– C. 1355-1361.
52. Dobbs N. et al. STING activation by translocation from the ER is associated with infection and autoinflammatory disease // *Cell host & microbe.*– 2015.– T. 18.– №. 2.– C. 157-168.
53. Fadok V. A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages // *The Journal of Immunology.*– 1992.– T. 148.– №. 7.– C. 2207-2216.
54. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease // *Nature Reviews Immunology.*– 2007.– T. 7.– №. 9.– C. 690.
55. Fitzgerald K. A. et al. IKK ϵ and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway // *Nature immunology.*– 2003.– T. 4.– №. 5.– C. 491.
56. Fricker N. et al. Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro-and antiapoptotic role of cFLIP L // *The Journal of cell biology.*– 2010.– T. 190.– №. 3.– C. 377-389.
57. Fuchs Y., Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells // *Nature reviews Molecular cell biology.* – 2015. – T. 16. – №. 6. – C. 329.
58. Fuertes M. B. et al. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells // *Journal of Experimental Medicine.*– 2011.– T. 208.– №. 10.– C. 2005-2016.
59. Gao D. et al. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses // *Science.*– 2013.– T. 341.– №. 6148.– C. 903-906.
60. Gao P. et al. Binding-pocket and lid-region substitutions render human STING sensitive to the species-specific drug DMXAA // *Cell reports.*– 2014.– T. 8.– №. 6.– C. 1668-1676.
61. Gao P. et al. Structure-function analysis of STING activation by c [G (2', 5') pA (3', 5') p] and targeting by antiviral DMXAA // *Cell.*– 2013.– T. 154.– №. 4.– C. 748-762.
62. Gardner B. M., Walter P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response // *Science.*– 2011.– T. 333.– №. 6051.– C. 1891-1894.
63. Gaut J. R., Hendershot L. M. The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum // *Current opinion in cell biology.*– 1993.– T. 5.– №. 4.– C. 589-595.

64. Gelman A. E. et al. The adaptor molecule MyD88 activates PI-3 kinase signaling in CD4⁺ T cells and enables CpG oligodeoxynucleotide-mediated costimulation // *Immunity*.– 2006.– T. 25.– №. 5.– C. 783-793.
65. Gelman A. E. et al. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4⁺ T cell survival // *The Journal of Immunology*.– 2004.– T. 172.– №. 10.– C. 6065-6073.
66. Gelman A. E. et al. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4⁺ T cell survival // *The Journal of Immunology*.– 2004.– T. 172.– №. 10.– C. 6065-6073.
67. Giampietri C. et al. Necroptosis: molecular signalling and translational implications // *International journal of cell biology*.– 2014.– T. 2014.
68. Green D. R., Droin N., Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells // *Immunological reviews*.– 2003.– T. 193.– №. 1.– C. 70-81.
69. Häcki J. et al. Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2 // *Oncogene*.– 2000.– T. 19.– №. 19.– C. 2286.
70. Hao Z. et al. Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis // *Cell*.– 2005.– T. 121.– №. 4.– C. 579-591.
71. Harding H. P. et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress // *Molecular cell*.– 2003.– T. 11.– №. 3.– C. 619-633.
72. Harding H. P. et al. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response // *Molecular cell*.– 2000.– T. 5.– №. 5.– C. 897-904.
73. Harding H. P., Zhang Y., Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase // *Nature*.– 1999.– T. 397.– №. 6716.– C. 271.
74. Hare D. N. et al. Membrane perturbation-associated Ca²⁺ signaling and incoming genome sensing are required for the host response to low-level enveloped virus particle entry // *Journal of virology*.– 2016.– T. 90.– №. 6.– C. 3018-3027.
75. Härtlova A. et al. DNA damage primes the type I interferon system via the cytosolic DNA sensor STING to promote anti-microbial innate immunity // *Immunity*.– 2015.– T. 42.– №. 2.– C. 332-343.
76. Hatai T. et al. Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation // *Journal of Biological Chemistry*.– 2000.– T. 275.– №. 34.– C. 26576-26581.

77. Havenar-Daughton C., Kolumam G. A., Murali-Krishna K. Cutting Edge: The direct action of type I IFN on CD4 T cells is critical for sustaining clonal expansion in response to a viral but not a bacterial infection // *The Journal of Immunology*.– 2006.– T. 176.– №. 6.– C. 3315-3319.
78. Haze K. et al. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress // *Molecular biology of the cell*.– 1999.– T. 10.– №. 11.– C. 3787-3799.
79. He C., Klionsky D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy // *Annual review of genetics*.– 2009.– T. 43.
80. He S. et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF α // *Cell*.– 2009.– T. 137.– №. 6.– C. 1100-1111.
81. Heath-Engel H. M., Chang N. C., Shore G. C. The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family // *Oncogene*.– 2008.– T. 27.– №. 50.– C. 6419.
82. Hengartner M. O., Horvitz H. R. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* // *Current opinion in genetics & development*.– 1994.– T. 4.– №. 4.– C. 581-586.
83. Hervas-Stubbs S. et al. Direct effects of type I interferons on cells of the immune system // *Clinical Cancer Research*.– 2011.– T. 17.– №. 9.– C. 2619-2627.
84. Hitoshi Y. et al. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells // *Immunity*.– 1998.– T. 8.– №. 4.– C. 461-471.
85. Hollien J. et al. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells // *The Journal of cell biology*.– 2009.– T. 186.– №. 3.– C. 323-331.
86. Holm C. K. et al. Influenza A virus targets a cGAS-independent STING pathway that controls enveloped RNA viruses // *Nature communications*.– 2016.– T. 7.– C. 10680.
87. Holm C. K. et al. Virus-cell fusion as a trigger of innate immunity dependent on the adaptor STING // *Nature immunology*.– 2012.– T. 13.– №. 8.– C. 737.
88. Hu Y., Ivashkiv L. B. Costimulation of chemokine receptor signaling by matrix metalloproteinase-9 mediates enhanced migration of IFN- α dendritic cells // *The Journal of Immunology*.– 2006.– T. 176.– №. 10.– C. 6022-6033.
89. Huang Y. H. et al. The structural basis for the sensing and binding of cyclic di-GMP by STING // *Nature structural and molecular biology*.– 2012.– T. 19.– №. 7.– C. 728.

90. Huber J. P. et al. Cutting edge: Type I IFN reverses human Th2 commitment and stability by suppressing GATA3 // *the Journal of Immunology*.– 2010.– T. 185.– №. 2.– C. 813-817.
91. Inaba K. et al. Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo // *International reviews of immunology*.– 1990.– T. 6.– №. 2-3.– C. 197-206.
92. Ishikawa H., Barber G. N. Sting is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signaling // *Cytokine*.– 2009.– T. 48.– №. 1-2.– C. 128.
93. Ishikawa H., Ma Z., Barber G. N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity // *Nature*.– 2009.– T. 461.– №. 7265.– C. 788.
94. Itoh N. et al. The polypeptide encoded by the μ DHA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis // *Cell*.– 1991.– T. 66.– №. 2.– C. 233-243.
95. Jeong J. et al. Alterations in the expression and modification of histones in the liver after injury // *Experimental and molecular pathology*.– 2003.– T. 75.– №. 3.– C. 256-264.
96. Jiang Y. et al. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains // *Science*.– 1999.– T. 283.– №. 5401.– C. 543-546.
97. Jin L. et al. MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals // *Molecular and cellular biology*.– 2008.– T. 28.– №. 16.– C. 5014-5026.
98. Jin L., Lenz L. L., Cambier J. C. Cellular reactive oxygen species inhibit MPYS induction of IFN β // *PLoS One*.– 2010.– T. 5.– №. 12.– C. e15142.
99. Jodo S. et al. CD95 (Fas) ligand-expressing vesicles display antibody-mediated, FcR-dependent enhancement of cytotoxicity // *The Journal of Immunology*.– 2000.– T. 165.– №. 10.– C. 5487-5494.
100. Jorgensen I., Rayamajhi M., Miao E. A. Programmed cell death as a defence against infection // *Nature reviews immunology*. – 2017. – T. 17. – №. 3. – C. 151.
101. Jost P. J. et al. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis // *Nature*.– 2009.– T. 460.– №. 7258.– C. 1035-1039.
102. Joza N. et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death // *Nature*.– 2001.– T. 410.– №. 6828.– C. 549.
103. Kāgi D. et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice // *Nature*.– 1994.– T. 369.– №. 6475.– C. 31.

104. Kallenberger S. M. et al. Intra-and interdimeric caspase-8 self-cleavage controls strength and timing of CD95-induced apoptosis // *Science signaling*.– 2014.– T. 7.– №. 316.– C. ra23.
105. Kaser A., Nagata S., Tilg H. Interferon α augments activation-induced T cell death by upregulation of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression // *Cytokine*.– 1999.– T. 11.– №. 10.– C. 736-743.
106. Kaufman R. J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease // *The Journal of clinical investigation*.– 2002.– T. 110.– №. 10.– C. 1389-1398.
107. Kaufmann T., Strasser A., Jost P. J. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP // *Cell Death & Differentiation*.– 2012.– T. 19.– №. 1.– C. 42-50.
108. Kavrochorianou N. et al. IFNAR signaling directly modulates T lymphocyte activity, resulting in milder experimental autoimmune encephalomyelitis development // *Journal of leukocyte biology*.– 2016.– T. 99.– №. 1.– C. 175-188.
109. Kawane K. et al. Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation // *Nature immunology*.– 2003.– T. 4.– №. 2.– C. 138.
110. Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics // *British journal of cancer*.– 1972.– T. 26.– №. 4.– C. 239.
111. Kim R. et al. Role of the unfolded protein response in cell death // *Apoptosis*.– 2006.– T. 11.– №. 1.– C. 5-13.
112. Kischkel F. C. et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor // *The EMBO journal*.– 1995.– T. 14.– №. 22.– C. 5579-5588.
113. Kolumam G. A. et al. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection // *Journal of Experimental Medicine*.– 2005.– T. 202.– №. 5.– C. 637-650.
114. Konno H., Konno K., Barber G. N. Cyclic dinucleotides trigger ULK1 (ATG1) phosphorylation of STING to prevent sustained innate immune signaling // *Cell*.– 2013.– T. 155.– №. 3.– C. 688-698.
115. Kotzin J. J. et al. The long non-coding RNA Morrbid regulates Bim and short-lived myeloid cell lifespan // *Nature*.– 2016.– T. 537.– №. 7619.– C. 239.

116. Krammer P. H., Arnold R., Lavrik I. N. Life and death in peripheral T cells // Nature reviews. Immunology.– 2007.– T. 7.– №. 7.– C. 532.
117. Kulkarni R., Behboudi S., Sharif S. Insights into the role of Toll-like receptors in modulation of T cell responses // Cell and tissue research.– 2011.– T. 343.– №. 1.– C. 141-152.
118. Kurts C. et al. Cutting edge: dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo // The Journal of Immunology.– 2001.– T. 166.– №. 3.– C. 1439-1442.
119. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // nature.– 1970.– T. 227.– №. 5259.– C. 680.
120. Lancioni C. L., Thomas J. J., Rojas R. E. Activation requirements and responses to TLR ligands in human CD4+ T cells: comparison of two T cell isolation techniques // Journal of immunological methods.– 2009.– T. 344.– №. 1.– C. 15-25.
121. Landrigan A., Wong M. T., Utz P. J. CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides directly costimulate mouse and human CD4+ T cells through a TLR9-and MyD88-independent mechanism // The Journal of Immunology.– 2011.– T. 187.– №. 6.– C. 3033-3043.
122. Larkin B. et al. Cutting edge: activation of STING in T cells induces type I IFN responses and cell death //The Journal of Immunology. – 2017. – T. 199. – №. 2. – C. 397-402.
123. LaRosa D. F. et al. CpG DNA inhibits CD4+ CD25+ Treg suppression through direct MyD88-dependent costimulation of effector CD4+ T cells // Immunology letters.– 2007.– T. 108.– №. 2.– C. 183-188.
124. Laster S. M., Wood J. G., Gooding L. R. Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis // The Journal of Immunology.– 1988.– T. 141.– №. 8.– C. 2629-2634.
125. Le Bon A. et al. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon // Nature immunology.– 2003.– T. 4.– №. 10.– C. 1009.
126. Le Bon A. et al. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo // Immunity.– 2001.– T. 14.– №. 4.– C. 461-470.

127. Lee A. H., Iwakoshi N. N., Glimcher L. H. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response // *Molecular and cellular biology*.– 2003.– T. 23.– №. 21.– C. 7448-7459.
128. Lewis R. S. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes // *Annual review of immunology*.– 2001.– T. 19.– №. 1.– C. 497-521.
129. Li X. D. et al. Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects // *Science*.– 2013.– T. 341.– №. 6152.– C. 1390-1394.
130. Lin J. H. et al. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response // *science*.– 2007.– T. 318.– №. 5852.– C. 944-949.
131. Lindsten T. et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues // *Molecular cell*.– 2000.– T. 6.– №. 6.– C. 1389-1399.
132. Linkermann A., Green D. R. Necroptosis // *New England Journal of Medicine*.– 2014.– T. 370.– №. 5.– C. 455-465.
133. Lippmann J. et al. Dissection of a type I interferon pathway in controlling bacterial intracellular infection in mice // *Cellular microbiology*.– 2011.– T. 13.– №. 11.– C. 1668-1682.
134. Liu X. et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c // *Cell*.– 1996.– T. 86.– №. 1.– C. 147-157.
135. Liu Y. P. et al. Endoplasmic reticulum stress regulates the innate immunity critical transcription factor IRF3 // *The Journal of Immunology*.– 2012.– T. 189.– №. 9.– C. 4630-4639.
136. Lorenzi S. et al. Type I IFNs control antigen retention and survival of CD8 α + dendritic cells after uptake of tumor apoptotic cells leading to cross-priming // *The Journal of Immunology*.– 2011.– T. 186.– №. 9.– C. 5142-5150.
137. Macián F. et al. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance // *Cell*.– 2002.– T. 109.– №. 6.– C. 719-731.
138. MacLeod H., Wetzler L. M. T cell activation by TLRs: a role for TLRs in the adaptive immune response // *Sci. STKE*.– 2007.– T. 2007.– №. 402.– C. pe48-pe48.
139. MacLeod H., Wetzler L. M. T cell activation by TLRs: a role for TLRs in the adaptive immune response // *Sci. STKE*.– 2007.– T. 2007.– №. 402.– C. pe48-pe48.

140. Madkaikar M. et al. Advances in autoimmune lymphoproliferative syndromes // European journal of haematology.– 2011.– T. 87.– №. 1.– C. 1-9.
141. Mahieu T. et al. The wild-derived inbred mouse strain SPRET/Ei is resistant to LPS and defective in IFN- β production // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.– 2006.– T. 103.– №. 7.– C. 2292-2297.
142. Manichaikul A. et al. A model selection approach for the identification of quantitative trait loci in experimental crosses, allowing epistasis // Genetics.– 2009.– T. 181.– №. 3.– C. 1077-1086.
143. Marrack P., Kappler J. Control of T cell viability // Annu. Rev. Immunol.– 2004.– T. 22.– C. 765-787.
144. Marrack P., Kappler J., Mitchell T. Type I interferons keep activated T cells alive // Journal of Experimental Medicine.– 1999.– T. 189.– №. 3.– C. 521-530.
145. Marsden V. S. et al. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome // Nature.– 2002.– T. 419.– №. 6907.– C. 634.
146. Martinvalet D., Zhu P., Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis // Immunity.– 2005.– T. 22.– №. 3.– C. 355-370.
147. Mason K. D. et al. Proapoptotic Bak and Bax guard against fatal systemic and organ-specific autoimmune disease // Proceedings of the National Academy of Sciences.– 2013.– T. 110.– №. 7.– C. 2599-2604.
148. McKeage M. J. et al. Phase II study of ASA404 (vadimezan, 5, 6-dimethylxanthenone-4-acetic acid/DMXAA) 1800 mg/m² combined with carboplatin and paclitaxel in previously untreated advanced non-small cell lung cancer // Lung Cancer.– 2009.– T. 65.– №. 2.– C. 192-197.
149. Mendes C. S. et al. Cytochrome c-d regulates developmental apoptosis in the *Drosophila* retina // EMBO reports.– 2006.– T. 7.– №. 9.– C. 933-939.
150. Metidji A. et al. IFN- α/β receptor signaling promotes regulatory T cell development and function under stress conditions // The Journal of Immunology.– 2015.– T. 194.– №. 9.– C. 4265-4276.

151. Micheau O. et al. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex // *Journal of Biological Chemistry*.– 2002.– T. 277.– №. 47.– C. 45162-45171.
152. Miura M. et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3* // *Cell*.– 1993.– T. 75.– №. 4.– C. 653-660.
153. Monroe K. M. et al. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV // *Science*.– 2014.– T. 343.– №. 6169.– C. 428-432.
154. Montoya M. et al. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation // *Blood*.– 2002.– T. 99.– №. 9.– C. 3263-3271.
155. Murphy K., Weaver C. *Janeway's immunobiology*.– Garland Science, 2016.
156. Muzio M. et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex // *Cell*.– 1996.– T. 85.– №. 6.– C. 817-827.
157. Nagasaka A. et al. Apaf-1-independent programmed cell death in mouse development // *Cell death and differentiation*.– 2010.– T. 17.– №. 6.– C. 931.
158. Nakagawa T., Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families: activation of caspase-12 by calpain in apoptosis // *The Journal of cell biology*.– 2000.– T. 150.– №. 4.– C. 887-894.
159. Neumann L. et al. Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells // *Molecular systems biology*.– 2010.– T. 6.– №. 1.– C. 352.
160. Nishimura Y. et al. In vivo analysis of Fas antigen-mediated apoptosis: effects of agonistic anti-mouse FasAb on thymus, spleen and liver // *International immunology*.– 1997.– T. 9.– №. 2.– C. 307-316.
161. Nishitoh H. et al. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2 // *Molecular cell*.– 1998.– T. 2.– №. 3.– C. 389-395.
162. Oberg H. H. et al. Differential but direct abolishment of human regulatory T cell suppressive capacity by various TLR2 ligands // *The Journal of Immunology*.– 2010.– T. 184.– №. 9.– C. 4733-4740.
163. Oberg H. H. et al. Regulation of T cell activation by TLR ligands // *European journal of cell biology*.– 2011.– T. 90.– №. 6-7.– C. 582-592.

164. Oh-Hora M. et al. Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance // *Nature immunology*.– 2008.– T. 9.– №. 4.– C. 432.
165. Ouyang S. et al. Structural analysis of the STING adaptor protein reveals a hydrophobic dimer interface and mode of cyclic di-GMP binding // *Immunity*.– 2012.– T. 36.– №. 6.– C. 1073-1086.
166. Paludan S. R., Bowie A. G. Immune sensing of DNA // *Immunity*.– 2013.– T. 38.– №. 5.– C. 870-880.
167. Parlato S. et al. Expression of CCR-7, MIP-3 β , and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities // *Blood*.– 2001.– T. 98.– №. 10.– C. 3022-3029.
168. Patterson S. D. et al. Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition // *Cell death and differentiation*.– 2000.– T. 7.– №. 2.– C. 137.
169. Pop C. et al. FLIPL induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity // *Biochemical Journal*.– 2011.– T. 433.– №. 3.– C. 447-457.
170. Prantner D. et al. 5, 6-Dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) activates stimulator of interferon gene (STING)-dependent innate immune pathways and is regulated by mitochondrial membrane potential // *Journal of Biological Chemistry*.– 2012.– T. 287.– №. 47.– C. 39776-39788.
171. Proietti E. et al. Type I IFN as a natural adjuvant for a protective immune response: lessons from the influenza vaccine model // *The Journal of Immunology*.– 2002.– T. 169.– №. 1.– C. 375-383.
172. Ram D. R. et al. Balance between short and long isoforms of cFLIP regulates Fas-mediated apoptosis in vivo // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2016. – T. 113. – №. 6. – C. 1606-1611.
173. Rathmell J. C. et al. CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4⁺ T cells // *Nature*.– 1995.– T. 376.– №. 6536.– C. 181.
174. Rep M. H. G. et al. Recombinant interferon- β blocks proliferation but enhances interleukin-10 secretion by activated human T-cells // *Journal of neuroimmunology*.– 1996.– T. 67.– №. 2.– C. 111-118.

175. Reynolds J. M., Dong C. Toll-like receptor regulation of effector T lymphocyte function // Trends in immunology.– 2013.– T. 34.– №. 10.– C. 511-519.
176. Roberts Z. J., Ching L. M., Vogel S. N. IFN- β -dependent inhibition of tumor growth by the vascular disrupting agent 5, 6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) // Journal of Interferon & Cytokine Research.– 2008.– T. 28.– №. 3.– C. 133-139.
177. Rogaev E. I. et al. Genotype analysis identifies the cause of the “royal disease” // Science.– 2009.– T. 326.– №. 5954.– C. 817-817.
178. Ron D., Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response // Nature reviews Molecular cell biology.– 2007.– T. 8.– №. 7.– C. 519.
179. Rongvaux A. et al. Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA // Cell.– 2014.– T. 159.– №. 7.– C. 1563-1577.
180. Saitoh T. et al. Atg9a controls ДНДНК-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response // Proceedings of the National Academy of Sciences.– 2009.– T. 106.– №. 49.– C. 20842-20846.
181. Saitoh T. et al. Regulation of ДНДНК-induced innate immune responses by membrane trafficking // Autophagy.– 2010.– T. 6.– №. 3.– C. 430-432.
182. Sauer J. D. et al. The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the in vivo interferon response to Listeria monocytogenes and cyclic dinucleotides // Infection and immunity.– 2011.– T. 79.– №. 2.– C. 688-694.
183. Scaffidi C. et al. The role of cFLIP in modulation of CD95-induced apoptosis // Journal of Biological Chemistry.– 1999.– T. 274.– №. 3.– C. 1541-1548.
184. Scheuner D. et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis // Molecular cell.– 2001.– T. 7.– №. 6.– C. 1165-1176.
185. Schoggins J. W. et al. Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity // Nature.– 2014.– T. 505.– №. 7485.– C. 691.
186. Schuler M., Green D. R. Mechanisms of p53-dependent apoptosis.– 2001.
187. Shamu C. E., Walter P. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus // The EMBO journal.– 1996.– T. 15.– №. 12.– C. 3028-3039.
188. Shang G. et al. Crystal structures of STING protein reveal basis for recognition of cyclic di-GMP // Nature structural and molecular biology.– 2012.– T. 19.– №. 7.– C. 725.

189. Shao C. et al. Mechanisms for U2AF to define 3' splice sites and regulate alternative splicing in the human genome // *Nature structural & molecular biology*.– 2014.– T. 21.– №. 11.– C. 997-1005.
190. Sharief M. K., Semra Y. K. Down-regulation of survivin expression in T lymphocytes after interferon beta-1a treatment in patients with multiple sclerosis // *Archives of neurology*.– 2002.– T. 59.– №. 7.– C. 1115-1121.
191. Sharma S. et al. Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the *Plasmodium falciparum* genome // *Immunity*.– 2011.– T. 35.– №. 2.– C. 194-207.
192. Sharma S. et al. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway // *Science*.– 2003.– T. 300.– №. 5622.– C. 1148-1151.
193. Shi J., Gao W., Shao F. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death // *Trends in biochemical sciences*. – 2017. – T. 42. – №. 4. – C. 245-254.
194. Shinohara M. L. et al. Engagement of the type I interferon receptor on dendritic cells inhibits T helper 17 cell development: role of intracellular osteopontin // *Immunity*.– 2008.– T. 29.– №. 1.– C. 68-78.
195. Shirley S., Micheau O. The heme oxygenase-1 and cFLIP in acute myeloid leukemias: two non-redundant but mutually exclusive cellular safeguards protecting cells against TNF-induced cell death? // *Oncotarget*. – 2010. – T. 1. – №. 5. – C. 317.
196. Shu C. et al. Structure of STING bound to cyclic di-GMP reveals the mechanism of cyclic dinucleotide recognition by the immune system // *Nature structural and molecular biology*.– 2012.– T. 19.– №. 7.– C. 722.
197. Škrnjug I., Guzmán C. A., Ruecker C. Cyclic GMP-AMP displays mucosal adjuvant activity in mice // *PloS one*.– 2014.– T. 9.– №. 10.– C. e110150.
198. Smith J. A. et al. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response are linked to synergistic IFN- β induction via X-box binding protein 1 // *European journal of immunology*.– 2008.– T. 38.– №. 5.– C. 1194-1203.
199. Smith-Garvin J. E., Koretzky G. A., Jordan M. S. T cell activation // *Annual review of immunology*.– 2009.– T. 27.– C. 591-619.
200. Sriskantharajah S. et al. Proteolysis of NF- κ B1 p105 is essential for T cell antigen receptor-induced proliferation // *Nature immunology*.– 2009.– T. 10.– №. 1.– C. 38.

201. Srivastava S. et al. Type I interferons directly inhibit regulatory T cells to allow optimal antiviral T cell responses during acute LCMV infection // *Journal of Experimental Medicine*.– 2014.– C. jem. 20131556.
202. Srivastava S., Koch L. K., Campbell D. J. IFN α R Signaling in Effector but Not Regulatory T Cells Is Required for Immune Dysregulation during Type I IFN–Dependent Inflammatory Disease // *The Journal of Immunology*.– 2014.– T. 193.– №. 6.– C. 2733-2742.
203. Staelens J. et al. Hyporesponsiveness of SPRET/Ei mice to lethal shock induced by tumor necrosis factor and implications for a TNF -based antitumor therapy // *Proceedings of the National Academy of Sciences*.– 2002.– T. 99.– №. 14.– C. 9340-9345.
204. Suda T. et al. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family // *Cell*.– 1993.– T. 75.– №. 6.– C. 1169-1178.
205. Sun L. et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase // *Cell*.– 2012.– T. 148.– №. 1.– C. 213-227.
206. Sun L. et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase // *Cell*.– 2012.– T. 148.– №. 1.– C. 213-227.
207. Sun W. et al. ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization // *Proceedings of the National Academy of Sciences*.– 2009.– T. 106.– №. 21.– C. 8653-8658.
208. Szegezdi E. et al. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis // *EMBO reports*.– 2006.– T. 7.– №. 9.– C. 880-885.
209. Szegezdi E. et al. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis // *EMBO reports*.– 2006.– T. 7.– №. 9.– C. 880-885.
210. Tabas I., Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress // *Nature cell biology*.– 2011.– T. 13.– №. 3.– C. 184.
211. Tabas I., Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress // *Nature cell biology*.– 2011.– T. 13.– №. 3.– C. 184.
212. Takahashi T. et al. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand // *Cell*.– 1994.– T. 76.– №. 6.– C. 969-976.
213. Tang C. H. A. et al. Agonist-mediated activation of STING induces apoptosis in malignant B cells // *Cancer research*.– 2016.– T. 76.– №. 8.– C. 2137-2152.

214. Tang C. H. A. et al. Agonist-mediated activation of STING induces apoptosis in malignant B cells // *Cancer research.*– 2016.– T. 76.– №. 8.– C. 2137-2152.
215. Tang C. K. et al. The chemotherapeutic agent DMXAA as a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant // *PloS one.*– 2013.– T. 8.– №. 3.– C. e60038.
216. Terawaki S. et al. IFN- α directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity // *The Journal of Immunology.*– 2011.– T. 186.– №. 5.– C. 2772-2779.
217. Thomas S. G., Franklin-Tong V. E. Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen // *Nature.* – 2004. – T. 429. – №. 6989. – C. 305.
218. Thompson L. J. et al. Conditioning of naive CD4+ T cells for enhanced peripheral Foxp3 induction by nonspecific bystander inflammation // *Nature immunology.*– 2016.– T. 17.– №. 3.– C. 297.
219. Tijono S. M. et al. Identification of human-selective analogues of the vascular-disrupting agent 5, 6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) // *British journal of cancer.*– 2013.– T. 108.– №. 6.– C. 1306.
220. Tough D. F. Modulation of T-cell function by type I interferon // *Immunology & Cell Biology.*– 2012.– T. 90.– №. 5.– C. 492-497.
221. Tower J. Programmed cell death in aging // *Ageing research reviews.* – 2015. – T. 23. – C. 90-100.
222. Trapani J. A., Smyth M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway // *Nature Reviews Immunology.*– 2002.– T. 2.– №. 10.– C. 735.
223. Trapnell C. et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation // *Nature biotechnology.*– 2010.– T. 28.– №. 5.– C. 511.
224. Trapnell C., Pachter L., Salzberg S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq // *Bioinformatics.*– 2009.– T. 25.– №. 9.– C. 1105-1111.
225. Tuñón M. J. et al. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure // *World journal of gastroenterology: WJG.*– 2009.– T. 15.– №. 25.– C. 3086.
226. Unterholzner L. et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA // *Nature immunology.*– 2010.– T. 11.– №. 11.– C. 997.

227. Urano F. et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1 // *Science*.– 2000.– T. 287.– №. 5453.– C. 664-666.
228. Van Hautegeem T. et al. Only in dying, life: programmed cell death during plant development // *Trends in plant science*. – 2015. – T. 20. – №. 2. – C. 102-113.
229. Vaux D. L., Cory S., Adams J. M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells // *Nature*.– 1988.– T. 335.– №. 6189.– C. 440-442.
230. Vermes I. et al. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V // *Journal of immunological methods*.– 1995.– T. 184.– №. 1.– C. 39-51.
231. von Moltke J. et al. Recognition of bacteria by inflammasomes // *Annual review of immunology*.– 2013.– T. 31.– C. 73-106.
232. Walter P., Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation // *Science*.– 2011.– T. 334.– №. 6059.– C. 1081-1086.
233. Wei M. C. et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death // *Science*.– 2001.– T. 292.– №. 5517.– C. 727-730.
234. Weischenfeldt J., Porse B. Bone marrow-derived macrophages (BMM): isolation and applications // *Cold Spring Harbor Protocols*.– 2008.– T. 2008.– №. 12.– C. pdb. prot5080.
235. White K. et al. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila* // *Science*.– 1994.– T. 264.– №. 5159.– C. 677-683.
236. Wu E., Nance T., Montgomery S. B. SplicePlot: a utility for visualizing splicing quantitative trait loci // *Bioinformatics*.– 2013.– T. 30.– №. 7.– C. 1025-1026.
237. Wu X. et al. Molecular evolutionary and structural analysis of the cytosolic DNA sensor cGAS and STING // *Nucleic acids research*.– 2014.– T. 42.– №. 13.– C. 8243-8257.
238. Yin Q. et al. Cyclic di-GMP sensing via the innate immune signaling protein STING // *Molecular cell*.– 2012.– T. 46.– №. 6.– C. 735-745.
239. Yoshida H. et al. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development // *Cell*.– 1998.– T. 94.– №. 6.– C. 739-750.
240. Yoshida H. et al. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor // *Cell*.– 2001.– T. 107.– №. 7.– C. 881-891.

241. Youle R. J., Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death // *Nature reviews Molecular cell biology*.– 2008.– T. 9.– №. 1.– C. 47.
242. Yuan J. et al. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme // *Cell*.– 1993.– T. 75.– №. 4.– C. 641-652.
243. Zarembek K. A., Godowski P. J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines // *The journal of immunology*.– 2002.– T. 168.– №. 2.– C. 554-561.
244. Zhang Z. et al. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells // *Nature immunology*.– 2011.– T. 12.– №. 10.– C. 959.
245. Zhao J. et al. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF -induced necrosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*.– 2012.– T. 109.– №. 14.– C. 5322-5327.
246. Zhong B. et al. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation // *Immunity*.– 2008.– T. 29.– №. 4.– C. 538-550.
247. Zou H. et al. An APAF-1· cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9 // *Journal of Biological Chemistry*.– 1999.– T. 274.– №. 17.– C. 11549-11556.
248. Zou H. et al. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 // *Cell*.– 1997.– T. 90.– №. 3.– C. 405-413.
249. Zychlinsky A. et al. IpaB mediates macrophage apoptosis induced by *Shigella flexneri* // *Molecular microbiology*.– 1994.– T. 11.– №. 4.– C. 619-627.