

**АНАЛИЗ ЭФФЕКТА НОКДАУНА *Cdk5* НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ
ПОТЕНЦИАЛ Т-КЛЕТОЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ**

Илюшин Д. Р. ¹,
Арсентьев К. А. ¹,
Шардина К. Ю. ¹,
Южалин А. Е. ¹

¹ Научный центр трансляционной медицины, Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус».

**ANALYSIS OF THE EFFECT OF *Cdk5* KNOCKDOWN ON THE
CYTOTOXIC POTENTIAL OF T-CELL SUBPOPULATIONS**

Iliushin D. R. ^a,
Arsentiev K. A. ^a,
Shardina K. Yu. ^a,
Yuzhalin A. E. ^a

^a Research center for translational medicine, Sirius University of Science and Technology.

Резюме

Злокачественные новообразования (ЗНО) центральной нервной системы (ЦНС) имеют низкую иммуногенность, что ограничивает эффективность терапии и способствует неблагоприятному прогнозу для пациентов с данной патологией. В связи с этим становится актуальной разработка новых подходов к терапии, направленных на активацию противоопухолевого иммунного ответа. Важным кандидатом на роль регулятора молекулярных механизмов роста и пролиферации опухолей является атипичная циклин-зависимая киназа 5 (CDK5). Она участвует как в прогрессии опухоли и метастазировании, так и в обеспечении ускользания от ответа иммунной системы через регуляцию экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости первого класса (MHC-I) и контрольных точек иммунного ответа. Однако влияние CDK5 на функциональное состояние Т-клеточных субпопуляций и экспрессию ключевых цитотоксических эффекторов в микроокружении первичных и метастатических злокачественных новообразований остается малоизученным. Цель исследования – изучить влияние нокдауна гена *Cdk5* в опухолевых клетках ЦНС мышинной модели на функциональный статус цитотоксических Т-лимфоцитов в микроокружении злокачественных опухолей чтобы сопоставить экспериментальные результаты с клиническими данными пациентов с диагностированными опухолями ЦНС. Задачи включали: (1) анализ профиля экспрессии генов, ассоциированных с Т-клеточным ответом, по данным scRNA-seq в мышинной модели заболевания при нокдауне *Cdk5*; (2) валидацию изменений инфильтрации и экспрессии эффекторных молекул методом иммуногистохимии (ИГХ); (3) биоинформатическую оценку корреляции между уровнями экспрессии *CDK5* и цитотоксических генов в когортах пациентов с метастазами головного мозга и первичной глиобластомой на основе bulk- и scRNA-seq; (4) анализ влияния экспрессии эффекторных молекул на общую выживаемость пациентов. Полученные результаты демонстрируют влияние уровня экспрессии гена *CDK5* на транскрипционную активность генов основных эффекторных молекул Т-лимфоцитов, таких как перфорин и гранзимы. Следствием из проведенного анализа может быть возможность формулировки более точных прогнозов выживаемости пациентов исходя из уровня экспрессии *CDK5* и эффекторных молекул. Для полного понимания механизмов этого иммуномодулирующего эффекта необходимы дальнейшие исследования, направленные на выяснение условий и характеристик, способствующих иммуномодулирующему эффекту CDK5.

Ключевые слова: циклинзависимая киназа 5, опухоли центральной нервной системы, Т-клеточный ответ, гранзим В, корреляционный анализ, выживаемость.

Abstract

Malignant tumors of the central nervous system (CNS) are poorly immunogenic, which limits the effectiveness of therapies and contributes to an unfavorable prognosis for patients with this pathology. Therefore, the development of new approaches to treating this group of diseases is becoming increasingly important. Atypical cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) is involved in tumor progression and metastasis, as well as in the formation of immune escape by modifying the expression of MHC-I molecules and immune checkpoints, is an important candidate for regulating the molecular mechanisms of tumor growth. However, the influence of CDK5 on the functional state of T-cell subsets and the expression of key cytotoxic effectors in the microenvironment of primary and metastatic CNS cancers remains poorly understood. The aim of this study was to evaluate the effect of *Cdk5* gene knockdown in tumor cells of mouse model on the functional status of cytotoxic T lymphocytes in the microenvironment of CNS cancers for comparison of experimental results with clinical data of patients diagnosed with CNS tumors. The objectives were to: (1) analyze the expression profile of genes associated with the T cell response using scRNA-seq in a mouse model of *Cdk5* knockdown disease; (2) validate changes in infiltration and effector molecule expression using immunohistochemistry (IHC); (3) bioinformatically evaluate correlations between *CDK5* expression levels and cytotoxic genes in cohorts of patients with brain metastases and primary glioblastoma using bulk- and scRNA-seq; and (4) analyze the impact of effector molecule expression on overall patient survival. Our results indicate that *CDK5* expression levels influence the transcriptional activity of genes encoding key T cell effector molecules such as perforin or granzymes. The following of the analysis may be the possibility of formulating more accurate prognoses of patient survival based on the level of expression of CDK5 and effector molecules. Further studies are needed to elucidate the conditions and characteristics that mediate the immunomodulatory effect of CDK5.

Keywords: cyclin-dependent kinase 5, central nervous system tumors, T-cell response, granzyme B, correlation analysis, survival probability.

1 Введение

Опухоли центральной нервной системы (ОЦНС) представляют собой разнородную группу новообразований, для которых злокачественные формы характеризуются высоким уровнем смертности [1, 2] и ограниченной эффективностью стандартной терапии [3]. Химиотерапия сопровождается выраженной токсичностью [4, 5], а опухоли способны приобретать множественную лекарственную устойчивость [6], что подчеркивает необходимость поиска новых терапевтических мишеней, в том числе ориентированных на активацию иммунного ответа, а также изучения механизмов взаимодействия опухоли с иммунной системой для разработки новых классов иммунотерапии [3].

Одной из основных проблем, снижающих эффективность терапии ЗНО является метастазирование [7] – сложный процесс формирования вторичного очага опухоли из первичной [8]. Образование метастазов происходит вследствие метастатического каскада и успешного выживания клеток опухоли в условиях нового микроокружения [7, 8]. Это явление во многом отягощает течение заболевания и характеризует степень злокачественности опухоли [9]. Ключевым элементом адаптации к новому микроокружению при метастазировании является взаимодействие с иммунной системой организма с последующим уклонением от иммунного ответа [10]. В одной из работ, посвященных исследованию метастазов рака молочной железы (РМЖ) в головной мозг (ГМ) на мышинных моделях, сообщается о снижении уровня экспрессии молекул МНС-I, что снижает видимость опухоли для цитотоксических Т-лимфоцитов [11]. В основе данного механизма лежит активность белка CDK5 [11]. Схожий эффект, вызванный CDK5, был показан в исследованиях других злокачественных ОЦНС, например, медуллобластомы [12].

Участие CDK5 в механизмах пролиферации, миграции, инвазии метастазирования опухолевых клеток установлено в ряде исследований, [13, 14, 15]. В то же время, практически не изучено, как данный белок воздействует на функциональные свойства самих Т-лимфоцитов, включая экспрессию их основных цитотоксических эффекторов.

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния нокдауна гена *Cdk5* в опухолевых клетках на функциональный статус цитотоксических Т-лимфоцитов в микроокружении злокачественных опухолей ЦНС.

2 Материалы и методы

Секвенирование РНК отдельных клеток (scRNA-seq). В данном исследовании мы опирались на полученные результаты scRNA-seq, описанные в ранней публикации коллектива [11]. Вкратце, клеточную линию EO771 вводили в сонную артерию мышей линии C57BL/6. Перед инъекцией клетки подвергались стабильной трансфекции короткой шпилечной РНК, таргетирующей *Cdk5*, либо пустым вектором. По

44 достижению конечной точки извлеченные ОЦНС подвергались клеточному
45 сортированию на маркер CD45, после чего единичные иммунные клетки
46 секвенировали на чипах Chromium Next GEM Chip G (PN-1000120) с
47 разделительным маслом и гелевыми шариками с баркодами для отдельных
48 клеток с последующей амплификацией, подготовкой библиотек и
49 секвенированием на платформе Illumina.

50 **Иммуногистохимия.** Перед проведением иммуногистохимического
51 (ИГХ) окрашивания подготовку срезов проводили в соответствии с
52 протоколом, представленным ранее [11]. Метод включал фиксацию
53 образцов в формалине, получение срезов толщиной 8 мкм на микротоме,
54 депарафинизацию ксилолом, регидратацию дистиллированной водой,
55 демаскировку антигена в цитратном буфере, блокирование эндогенных
56 пероксидаз [11]. Следующим шагом являлось добавление первичных
57 антител (anti-GZMB 46890T, CellSignaling, 1:100) с последующей
58 инкубацией при +4°C в течение 18 часов. После промывки фосфатно-
59 соевым буфером препараты инкубировали с компонентами набора для
60 детекции Polink-2 HRP для кроличьих первичных антител (D41-18,
61 OriGene). В качестве хромогенного субстрата использовали 3,3'-
62 диаминобензидин. После инкубации промывали предметные стекла
63 дистиллированной водой и окрашивали гематоксилином Майера в течение
64 30 секунд (S3309, Aligent). Далее проводили промывку и дегидратацию в
65 этаноле, после чего образцы монтировали в среде (O8015, Sigma). Для
66 полуколичественной оценки популяций иммунных клеток в опухолевых
67 тканях окрашенные препараты сканировали с помощью сканера Aperio
68 AT2 DX (Leica Biosystems) при 40-кратном увеличении. Очаги без
69 инфильтрации исключали из анализа, при наблюдении на разных срезах
70 одного очага более одного раза, анализировали только один участок этого
71 очага. Для каждого препарата проводили подсчет клеток в каждом
72 метастазе. Нормализацию количества клеток при инфильтрации проводили
73 из расчета относительно площади очага на 100 мкм. Для анализа
74 использовали программное обеспечение ImageJ.

75 **Биоинформатический анализ и статистическая обработка данных.**
76 Статистический и биоинформатический анализы проводили с
77 использованием программных пакетов R версии 4.4.1 и Python версии
78 3.12.12. Для выборок с числом наблюдений $n < 30$ уровень статистической
79 значимости различий оценивали с применением непараметрического
80 критерия Манна–Уитни. Поиск и загрузку наборов данных, содержащих
81 уровни экспрессии генов, осуществляли из открытых биоинформатических
82 ресурсов The Cancer Genome Atlas (TCGA) и Cellxgene (GSE84465). Для
83 оценки взаимосвязи между уровнями экспрессии генов выполняли
84 корреляционный анализ с использованием коэффициента корреляции
85 Спирмена. Оценку выживаемости проводили непараметрическим методом
86 Каплана–Мейера. Визуализацию результатов осуществляли в виде диаграмм

87 рассеяния и ступенчатых кривых.

88 **3 Результаты**

89 **Результаты секвенирования РНК отдельных клеток иммунной** 90 **системы**

91 Профили экспрессии ключевых функциональных маркеров в
92 различных популяциях Т-лимфоцитов, полученные методом РНК-
93 секвенирования, представлены в виде тепловой карты на Рисунке 1. Анализ
94 данных выявил, что нокдаун *Cdk5* (группа *shCdk5*) приводит к достоверному
95 изменению экспрессии некоторых ключевых маркеров Т-клеток. В
96 популяции CD8⁺ Т-лимфоцитов (Рисунок 1В), а также в клетках
97 терминально дифференцированных эффекторов памяти (TEMRA; CD8⁺
98 Effector Memory CD45RA⁺) наблюдается повышение уровня экспрессии
99 *Gzmb* (Рисунок 1В). Кроме того, в группе *shCdk5* отмечена активация
100 экспрессии *Gzma* в популяции $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов (Рисунок 1В). Важно
101 отметить, что нокдаун *Cdk5* также повлиял на экспрессию *Gzma* и *Prf1* в
102 эффекторных клетках памяти (CD8⁺), а также сопровождался снижением
103 уровня мРНК *Mki67* в популяции $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов, что может указывать на
104 снижение их пролиферативного потенциала (Рисунок 1В). Важным
105 дополнением к снижению пролиферативной активности является
106 повышенная экспрессия маркера активации Т-клеток CD69 в популяции $\gamma\delta$ -
107 Т-клеток, а также популяциях CD4⁺ клетках центральной памяти и CD8⁺
108 эффекторных TEMRA клетках (Рисунок 1В). Полученная информация об
109 изменении профиля экспрессии позволяет охарактеризовать общую картину
110 изменений компонентов Т-клеточного иммунитета. Повышение экспрессии
111 генов, кодирующих эффекторные белки, а также маркера активации CD69
112 означает переход отдельных популяций Т-лимфоцитов в активное
113 эффекторное состояние. Этот вывод подчеркивается уменьшением
114 пролиферативной активности $\gamma\delta$ -Т-клеток со снижением уровня экспрессии
115 *Mki67*. Данный результат показывает, что нокдаун *Cdk5* приводит к
116 активации противоопухолевого иммунного ответа, опосредованного Т-
117 лимфоцитами.

118 Более детальный анализ уровней экспрессии исследуемых генов в
119 субпопуляциях $\alpha\beta$ -Т-лимфоцитов, а также $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов представлен на
120 Рисунке 2. В группе *shCdk5* наблюдалось снижение экспрессии *Gzmb* в CD8⁺
121 Т-клетках, (Рисунок 2Б). Напротив, популяция CD4⁺ клеток в этой группе
122 продемонстрировала повышенную экспрессию *Gzmb* по сравнению с контролем
123 (Рисунок 2А). Кроме того, нокдаун *Cdk5* сопровождался повышением
124 уровня экспрессии *Gzma* в эффекторных клетках TEMRA, а также
125 увеличением численности GZMA-позитивных CD8⁺ Т-лимфоцитов.
126 Высокий уровень экспрессии *Prf1* был выявлен в нескольких иммунных
127 популяциях, тогда как значимый уровень экспрессии маркера пролиферации
128 *Mki67* сохранился только в группе $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов. Обратим внимание на
129 противоположные эффекты нокдауна *Cdk5* для CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов.

130 Снижение уровня экспрессии *Gzmb* в CD8⁺ при повышении в CD4⁺ клетках
131 может указывать на обретение цитотоксических функций CD4⁺ Т-
132 лимфоцитами. При этом, уровень GZMB⁺ CD8⁺ клеток остался на высоком
133 уровне для популяции TEMRA, популяция клеток CD8⁺ центральной памяти
134 высоко экспрессировала *Gzmb*, а количество GZMB⁺ клеток снизилось.

135 **Валидация результатов scRNA-seq методом ИГХ**

136 Для валидации данных РНК-секвенирования было проведено ИГХ
137 окрашивание опухолевых срезов. Для валидации сравнивали группы по
138 наличию GZMB⁺ клеток, так как этот маркер показал наиболее достоверные
139 различия. Сравнение плотности GZMB⁺ Т-лимфоцитов в опухолевых срезах
140 между контрольной группой (shCtl) и группой нокдауна *Cdk5* (sh*Cdk5*)
141 (Рисунок 3А) выявило тенденцию к снижению инфильтрации в группе
142 sh*Cdk5*. При нормализации данных по площади, различия достигают
143 пограничного уровня значимости ($p = 0.065$, тест Манна-Уитни; рисунок 3
144 Б). Тенденция, показанная в данном эксперименте может указывать на то,
145 что степень инфильтрации опухоли GZMB⁺ Т-лимфоцитами не зависит
146 напрямую от нокдауна *Cdk5* однако все еще может оказывать существенное
147 влияние на формирование иных цитотоксических групп Т-лимфоцитов

148 **Биоинформатический анализ данных экспрессии у больных с** 149 **ОЦНС**

150 Следующим шагом стало соотнесение данных, полученных на
151 мышинной модели *in vivo* с данными пациентов с гистопатологически
152 подтвержденной глиобластомой либо метастазами в ГМ. Для анализа
153 выбирали значения экспрессии из наборов данных только для тех
154 эффекторных молекул, которые показали наличие зависимости от нокдауна
155 *Cdk5 in vivo* (рисунок 1).

156 Данные для оценки уровней экспрессии в метастазах меланомы в ГМ
157 были взяты из набора данных Fisher et al. Cancer Discov (не имеет
158 идентификатора GSE), включающего bulk уровни транскриптов из
159 опухолевых образцов [16]. Корреляционный анализ между уровнями
160 экспрессии *CDK5* и *GZMB* показал наличие слабой обратной корреляции (r
161 $= -0.099$, $p < 0.174$), что может говорить о несущественной тенденции к
162 снижению уровня *GZMB* при высокой экспрессии *CDK5*(рисунок 4).

163 Чтобы ответить на вопрос, какова роль *CDK5* в первичных опухолях
164 был проведен анализ данных bulk и scRNA-seq, взятых из открытых баз
165 данных. Для оценки зависимости экспрессии *CDK5* и *GZMB* на клиническом
166 материале первичных опухолей был проведен биоинформатический анализ
167 общедоступных данных bulk RNA-seq из TCGA (228 пациентов с
168 глиобластомой). Корреляционный анализ между суммарным уровнем
169 экспрессии *CDK5* и *GZMB* (по всем типам клеток в образце) показал слабую,
170 но статистически значимую положительную корреляцию ($r = 0.198$, $p < 0.01$;
171 рисунок 5 А). В то же время, при расчете зависимости уровня экспрессии
172 *GZMB* Т-клеток от уровня *CDK5* опухолевых

173

174 клеток метастазов (рисунок 5 Б) отмечена умеренная положительная
175 корреляция ($r = 0,49$, при $p < 0.01$). Наличие положительной корреляции
176 может указывать на то, что *CDK5* при экспрессии в клетках первичной
177 глиобластомы способствует приобретению Т-клетками микроокружения
178 опухоли эффекторной активности. Чтобы подтвердить релевантность
179 трансляционной мышшиной модели с метастазами ГМ была проведена
180 оценка корреляции экспрессии генов *GZMA*, *MKI67* и *PRF1* в зависимости
181 от уровня экспрессии *CDK5* в тотальной РНК доноров с метастазами ГМ.
182 Для *GZMA* была отмечена отрицательная тенденция ($r = -0.065$, $p > 0.05$;
183 рисунок 6 А).

184 Уровень *PRF1* при этом показали статистически значимую
185 корреляцию с *CDK5* ($r = -0.154$, $p < 0.05$; рисунок 6 В). В случае *MKI67*
186 отмечена статистически значимая ($p < 0.05$) слабая положительная
187 корреляция ($r = 0.199$; рисунок 6 Б). Это свидетельствует о том, что при
188 высоком уровне экспрессии *CDK5* клетками метастазов ГМ есть тенденция
189 к снижению эффекторной активности клетками Т-лимфоцитов при
190 повышении пролиферативной активности.

191 Дополнительно построена корреляция экспрессии генов *GZMA*,
192 *MKI67* и *PRF1* в зависимости от уровня экспрессии *CDK5* в тотальной РНК,
193 полученной у пациентов с первичными ОЦНС (рисунок 7 А-В). Показано
194 наличие статистически значимой слабopоложительной корреляции (r
195 (*GZMA*) = 0.177 , $p < 0.01$; r (*MKI67*) = 0.181 , $p < 0.01$) в каждом анализе. В
196 случае *PRF1* была определена слабая положительная корреляция, не
197 достигшая порога статистической значимости ($r = 0.097$; $p > 0.05$; рисунок 7
198 В).

199 Далее мы обратились к данным scRNA-seq (GSE84465). Для подтверждения
200 специфической связи между уровнем транскрипционной активности *CDK5*
201 и цитотоксическими генами в активных иммунных клетках был проведен
202 корреляционный анализ на основе данных scRNA-seq, ограниченный
203 популяцией Т-лимфоцитов (рисунок 7 Г-Е). В данном случае наблюдается
204 положительная корреляция для *GZMA* в зависимости от уровней *CDK5* ($r =$
205 0.49 , $p < 0.01$; рисунок 7 Г) и *PRF1* ($r = 0.54$, $p < 0.01$, рисунок 7 Е). Уровень
206 *MKI67*, судя по всему, не коррелирует с уровнем транскриптом *CDK5* в
207 опухолевых клетках ГМ ($r = 0.01$, $p < 0.01$; рисунок 7 Д). Данный анализ
208 показал, что в клетках глиобластомы и ее микроокружения картина
209 обратная той, что наблюдается при оценке транскрипционной активности
210 клеток метастазов. Пролиферативная активность в случае первичных
211 опухолей остается на крайне низком уровне, в то время как эффекторная
212 активность компонентов Т-клеточного иммунитета растет.

213 **Оценка влияния экспрессии эффекторных молекул на**
214 **выживаемость при ОЦНС**

215 Для оценки прогностической значимости выбранных маркеров Т-
216 лимфоцитов был проведен анализ выживаемости пациентов в зависимости
217 от уровня экспрессии генов ключевых эффекторных молекул (*GZMB*,
218 *GZMA*, *PRF1*), а также маркера пролиферации *MKI67*. При использовании
219 медианной стратификации пациентов с метастазами в ГМ статистически
220 значимых различий в общей выживаемости между группами с высокой и
221 низкой экспрессией *GZMB* выявлено не было. При более детальной
222 стратификации (тертили и квартили) было выявлено различие в показателе
223 выживаемости на интервале от 24 до 40 месяцев, однако статистической
224 значимости также не было установлено (Рисунок 8 Б, 8 В).

225 Аналогично, анализ когорты пациентов с первичными ОЦНС показал,
226 что их общая выживаемость не зависит от уровня экспрессии *GZMB*
227 (рисунок 8 А-В). Это может говорить о том, что *GZMB* не является
228 ключевой эффекторной молекулой, экспрессируемой Т-лимфоцитами
229 против клеток глиобластомы. Также это может свидетельствовать о том, что
230 *CDK5* опосредует изменение экспрессии *GZMB*, однако этого недостаточно
231 для того, чтобы улучшить прогноз пациентов.

232 Проведено аналогичное сравнение общей выживаемости для *GZMA*
233 (рисунок 9). В когорте пациентов с метастазами в ГМ (рисунок 9 А-В)
234 наблюдается повышение уровня общей выживаемости при высоком уровне
235 экспрессии этого гена. В то же время, при анализе данных пациентов с
236 первичными ОЦНС, значимых различий не было обнаружено (рисунок 9 Г-
237 Е). Данные результаты согласуются с полученной ранее информацией о
238 противоположном влиянии экспрессии *CDK5* на экспрессию маркеров Т-
239 лимфоцитов в глиобластоме и метастазах ГМ.

240 Уровень экспрессии *MKI67*, не продемонстрировал статистически
241 значимого влияния на общую выживаемость ни в одной из исследованных
242 когорт (рисунок 10). Данный факт можно объяснить тем, что повышенная
243 пролиферативная активность не означает непосредственное усиление
244 эффекторной функции Т-лимфоцитов.

245 Любопытно, что высокая экспрессия *PRF1* (рисунок 11 А-В) в случае
246 метастазов в ГМ может быть ассоциирована с благоприятным прогнозом
247 пациентов, при сравнении с пациентами с низкой экспрессией этого гена.
248 Данный факт объясняется тем, что *PRF1* является одной из важнейших
249 эффекторных молекул, определяющих цитотоксичность клеток иммунитета
250 [17] и повышенная эффекторная активность может быть ассоциирована с
251 благоприятным прогнозом [18, 19].

252 Примечательно, что для когорты пациентов с глиобластомой и
253 стратификацией по тертилям и квартилям, низкая экспрессия *PRF1* на
254 промежутке от 40 до 96 месяцев в целом связана с более высоким уровнем
255 показателя общей выживаемости, однако к концу периода эта разница
256 нивелировалась (рисунок 11 Г-Е). В целом, в случае первичных опухолей
257 *PRF1* не влиял на прогноз пациентов ($p > 0.05$).

259 4 Обсуждение результатов

260 В предыдущей работе коллектива было показано, что высокий
261 уровень CDK5 в ОЦНС коррелирует с пониженной экспрессией MHC-I [11].
262 При этом вопрос о влиянии активности CDK5 на функции компонентов Т-
263 клеточного иммунитета остается открытым. В данной работе было
264 рассмотрено влияние уровня экспрессии *Cdk5* на экспрессию некоторых
265 генов, ассоциированных с Т-клеточным иммунным ответом против
266 метастазов ОЦНС и глиобластомы. Уровень экспрессируемого *Cdk5* влиял
267 на транскрипционную активность Т-лимфоцитарных генов таких как
268 *GZMB*, *GZMA*, *PRF1* и *MKI67* в мышинных моделях метастазов, при этом
269 основное внимание было уделено зависимости уровня экспрессии генов от
270 *Cdk5* в различных компонентах Т-клеточного иммунитета.

271 Эксперименты *in vivo* позволили установить связь между активностью
272 CDK5 и экспрессируемыми ключевыми эффекторными молекулами Т-
273 клеток. Анализ результатов ИГХ показал лишь пограничный уровень
274 статистической значимости различий в инфильтрации *GZMB*⁺ Т-клетками
275 ($p = 0.065$), что может быть обусловлено низким размером выборки. Хотя
276 установлена тенденция к усилению инфильтрации очага метастазирования
277 *GZMB*⁺ клетками, это не опровергает возможное влияние CDK5 на
278 принимаемые популяциями Т-клеток фенотипы.

279 Действительно, выявленная тенденция согласуется с результатами
280 scRNA-seq анализа транскриптома мышинных моделей ОЦНС, который
281 показал что эффект нокдауна *Cdk5* дает неравномерный эффект в различных
282 популяциях Т-лимфоцитов. Мы заметили, что эффект нокдауна *Cdk5*
283 заметен в субпопуляциях $\alpha\beta$ -Т-лимфоцитов, а также $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов и
284 отражается в общей сложности на экспрессии генов, кодирующих
285 эффекторные молекулы *GZMB*, *GZMA*, *PRF1* и *MKI67*. Причем количество
286 *GZMB*⁺ CD8⁺ Т-лимфоцитов увеличилось, но CD4⁺ Т-лимфоцитов,
287 напротив, уменьшилось. Общее количество *GZMA*⁺ клеток увеличилось,
288 как и количество клеток, экспрессирующих транскрипты *PRF1*, данное
289 изменение наиболее заметно в субпопуляции клеток TEMRA, что может
290 означать усиление эффекторной активности микроокружения по
291 отношению к очагу опухоли.

292 Важный маркер пролиферативной активности *MKI67* показал
293 снижение уровня экспрессии в большинстве Т-клеточных субпопуляций.

294 Стоит отметить, что в популяции CD4⁺ клеток после нокдауна *CDK5*
295 существенно повысилась экспрессия маркера активации CD69, что говорит
296 о приобретении данной популяцией цитотоксической способности. По
297 данным литературы такие CD4⁺ клетки экспрессируют *GZMB* и *PRF1* в
298 больших количествах [20, 21]. Однако, исходя из результатов scRNA-seq
299 увеличения экспрессии вышеупомянутых генов в данной субпопуляции не
300 наблюдается. Напротив, уровень *GZMB*⁺ клеток снизился после нокдауна
301 *Cdk5*. Тем не менее, стоит отметить, что в остальных субпопуляциях CD4⁺
302 Т-лимфоцитов есть тенденция к увеличению количества клеток,
303 экспрессирующих *GZMB*, *GZMA* и *PRF1*. Отсутствие значительного

увеличения экспрессии эффекторных молекул можно объяснить тем, что несмотря на полученный сигнал активации, CD4⁺ Т-лимфоциты не всегда развивают цитотоксический фенотип, что описано в недавних работах [22, 23]. Низкая цитотоксичность может быть вызвана иммуносупрессивным воздействием опухолевого микроокружения, включающего различные механизмы иммуносупрессии, либо отсутствием необходимых для проявления цитотоксичности интерлейкинов. Таким образом, нокдаун *Cdk5* действительно приводит к формированию популяций Т-лимфоцитов, обладающих эффекторной активностью.

Помимо этого, анализ наборов TCGA и CellxGene (GSE84465) по уровням экспрессии в общем транскриптоме первичных опухолей показал наличие положительной корреляции между уровнями транскриптов *GZMB* и *CDK5*. Также, установлено наличие положительных корреляций для *GZMA* и *MKI67* от уровня *CDK5*.

Сила корреляции между *CDK5* и эффекторными молекулами сильно зависела от разрешающей способности проводимого анализа. Наблюдения по наличию корреляции подтвердились при более детальном анализе данных scRNA-seq (GSE84465), в которых значения экспрессии *GZMB* были взяты отдельно для Т-клеток, а значения экспрессии *CDK5* – для клеток ОЦНС, где положительная корреляция была еще более ярко выраженной. Высокие коэффициенты корреляции наблюдали при аналогичном анализе для белков *GZMA* и *PRF1*, однако *MKI67* не коррелирует с уровнем *CDK5* у пациентов с метастатическим поражением ГМ, это говорит о том, что активность *CDK5* влияет, в первую очередь, на цитотоксические свойства клеток иммунной системы, но не их пролиферативную активность.

Фактически, противоположную картину наблюдали в случае анализа экспрессии эффекторов при метастатическом поражении ГМ. В данном случае отмечали отрицательную корреляцию *GZMA*, *PRF1* и похожую тенденцию для *GZMB*, но это не относится к *MKI67*, уровень которого, напротив, возрастает при высокой экспрессии *CDK5*. Проведенный анализ показывает, что полученные данные *in vivo* могут быть сопоставлены с реальной клинической картиной пациентов с метастазами. Кроме того, это показывает, что нокдаун *Cdk5* может повысить цитотоксическую активность компонентов Т-клеточного иммунитета, находящихся вблизи метастаза. Однако, в случае первичной опухоли, корреляции *GZMA*, *GZMB* и *PRF1* положительные относительно уровня транскриптов *CDK5*. Данную ситуацию можно объяснить воспалительными процессами, протекающими в опухоли [24].

Таким образом, для успешного выживания опухолевым клеткам необходимо иметь развитые механизмы уклонения от иммунного ответа при сохранении высокой пролиферативной активности, чем объясняется отрицательная корреляция *GZMA*, *GZMB*, *PRF1* при повышении уровня транскриптов *MKI67* в метастазах ГМ.

347 Важным вопросом для определения роли нокдауна *Cdk5* в модуляции
348 реакции иммунного ответа с последующей модуляцией белков Т-клетками
349 стало определение зависимости показателя общей выживаемости от уровня
350 экспрессии *GZMB*, *GZMA*, *MKI67* и *PRF1*. Сначала, при стратификации
351 выборки на группы с высоким и низким уровнем экспрессии по медиане и
352 построении ступенчатой кривой выживаемости, не было установлено
353 влияния уровня экспрессии *GZMB* на прогноз злокачественных ОЦНС.
354 Однако, при представлении данных, взятых по квартилям, у пациентов с
355 метастазами ОЦНС, высокий уровень экспрессии *GZMB* был связан с более
356 благоприятными прогнозами, не достигнув при этом статистической
357 значимости.

358 Кроме того, высокая экспрессия *GZMA* и *PRF1* была сопряжена с
359 более высокими показателями выживаемости при разделении у пациентов с
360 метастазами ГМ, но не у пациентов с глиобластомой. В то же время, *MKI67*,
361 судя по проведенному анализу, не оказывает существенного влияния на
362 прогноз заболевания как первичной опухолью, так и при метастазах ГМ.
363 Исходя из данных выживаемости можно сформулировать вывод, что
364 позитивный эффект нокдауна *Cdk5* может быть достигнут в случае
365 метастатического поражения ГМ, но в случае первичной опухоли проблема
366 стоит более комплексно, и активация иммунного ответа зависит в том числе
367 и от других факторов, не связанных с молекулярным путем CDK5.

368 **5 Заключение**

369 Было установлено, что нокдаун *Cdk5* в мышинных моделях метастазов
370 ЦНС способствует активации экспрессии ключевых маркеров (*GZMB*,
371 *GZMA*, *PRF1*) в субпопуляциях Т-лимфоцитов. CD4⁺ Т-лимфоциты
372 усиливают экспрессию CD69, что говорит о приобретении данной
373 популяцией цитотоксической активности. Биологический эффект
374 реактивации Т-клеточного иммунитета подтверждается анализом
375 клинических данных, который выявил корреляцию между экспрессией
376 *CDK5* и цитотоксическими генами в опухолевом микроокружении
377 пациентов.

378 Ключевым выводом является то, что высокая экспрессия
379 эффекторных белков (*GZMB*, *GZMA*, *PRF1*) ассоциирована со значительно
380 улучшенной общей выживаемостью у пациентов с метастазами в ЦНС,
381 тогда как для доноров первичных опухолей ЦНС эта закономерность
382 выражена слабо либо отсутствует.

383 Таким образом, результаты данной работы указывают на CDK5 как на
384 потенциальную терапевтическую мишень для иммуномодуляции, а уровень
385 экспрессии эффекторных молекул цитотоксических клеток может служить
386 прогностическим фактором.

387 **Финансирование**

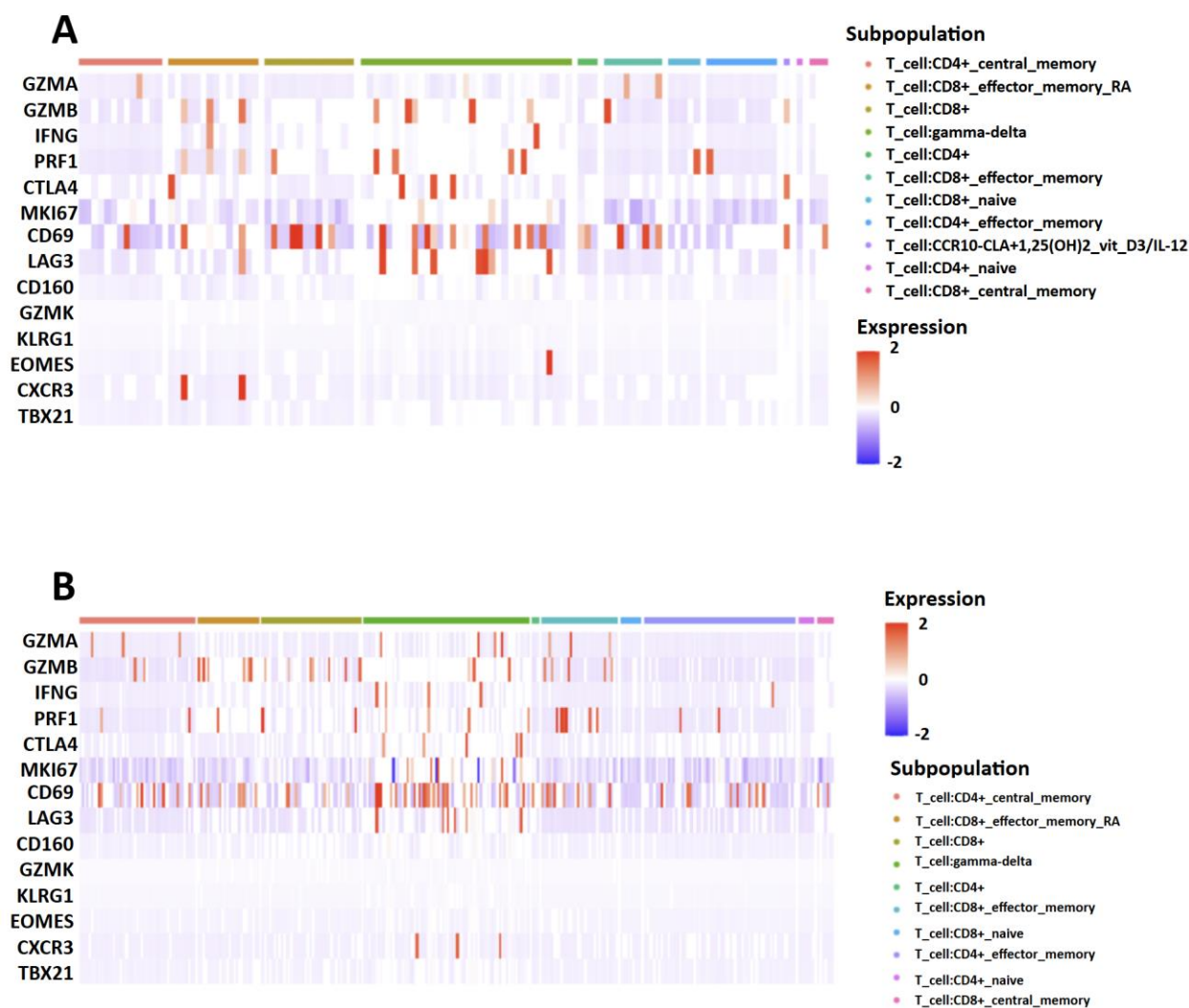
388 Результаты получены при финансовой поддержке исследования,
389 реализуемого в рамках государственной программы федеральной

390 территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной
391 территории «Сириус» (Соглашение №31-03 от 07.07.2025 г

РИСУНКИ

Рисунок 1. Тепловая карта экспрессии исследуемых генов с цветовыми обозначениями уровней экспрессии и типов клеток.

Figure 1. Heat map of the expression of the studied genes with color coding of expression levels and cell types.



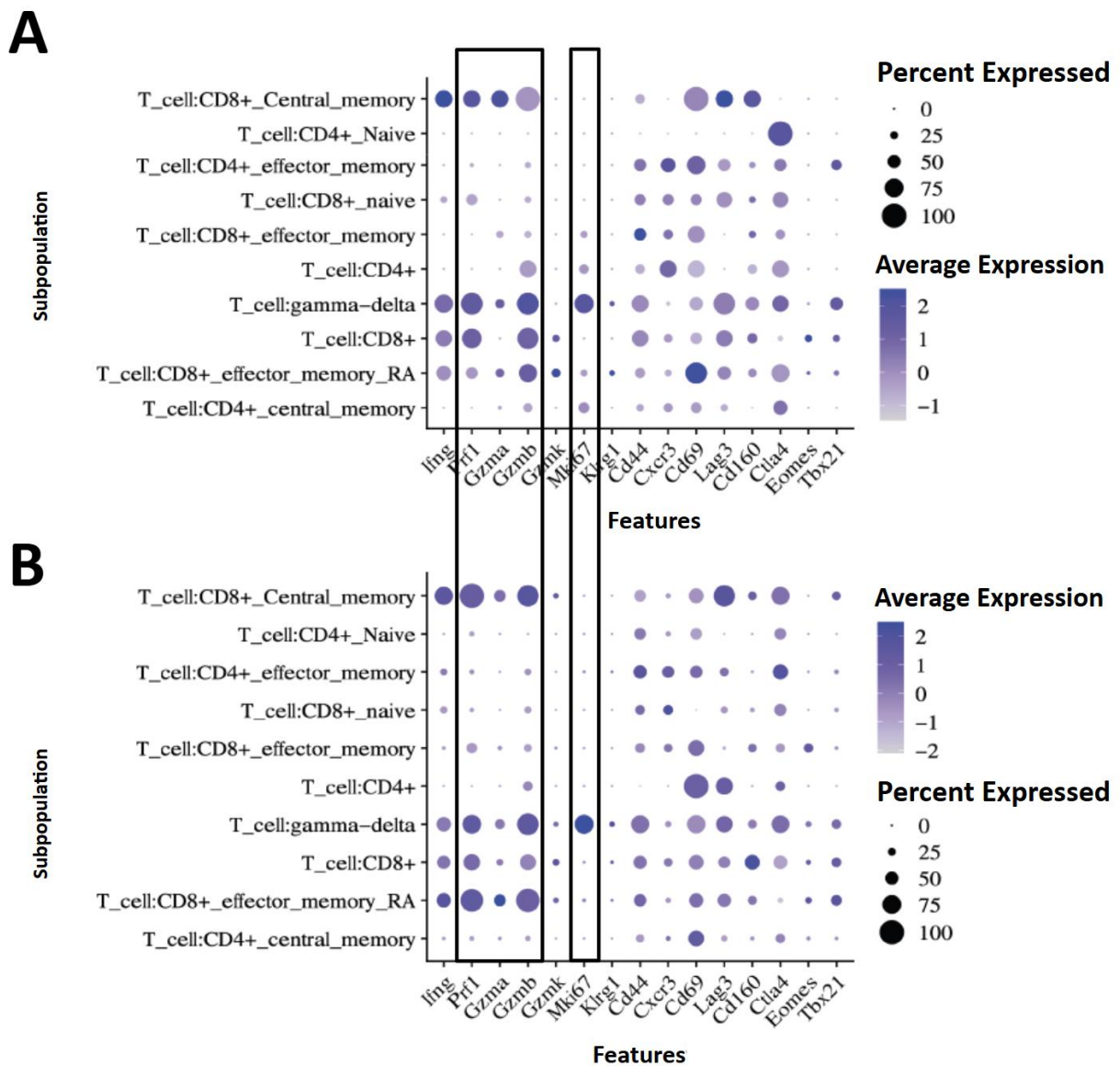
Примечание. Названия генов приведены в левой панели карты. Красный цвет в ячейке – высокий уровень экспрессии соответствующего гена, синий цвет – низкий уровень экспрессии. Обозначение Т-клеточных популяций приведено в правой панели. Верхняя панель отображает принадлежность ячеек к определенной субпопуляции Т-клеток. А – Карта, составленная на основе данных РНК-секвенирования для контрольной группы без нокдауна *Cdk5* (shCtl). Б – Карта, составленная на основе данных РНК-секвенирования для группы с нокдауном гена *Cdk5* (shCdk5).

Note. Gene names are shown in the left panel of the map. Red cells indicate high expression levels of the corresponding gene, and blue cells indicate low expression levels. T-cell populations are designated in the right panel. The top panel displays the T-cell subpopulation affiliation of cells. A – Map based on RNA-seq data for the

control group without *Cdk5* knockdown (shCtl). B – Map based on RNA-seq data for the group with *Cdk5* knockdown (sh*Cdk5*).

Рисунок 2. Точечные графики экспрессии в субпопуляциях.

Figure 2. Dot plots of expression in subpopulations.



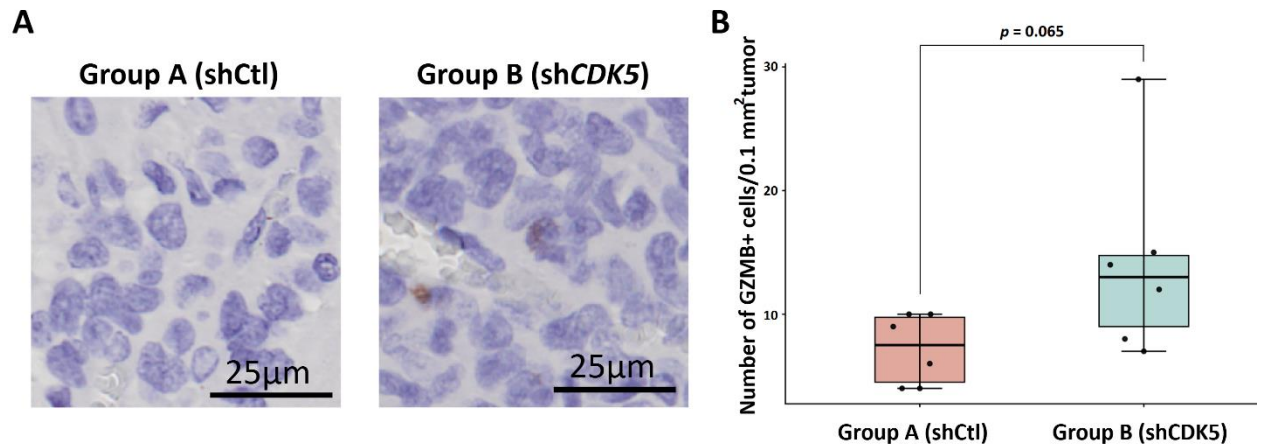
Примечание. Количественное сравнение уровня экспрессии отдельных генов (*GZMB*, *GZMA*, *PRF1*, *MKI67*) в конкретных субпопуляциях Т-клеток между группами *shCtl* и *shCdk5*. *T_cell:CD8+ Central memory* – $CD8^+$ Т-клетки центральной памяти, *T_cell:CD4+ Naive* – $CD4^+$ наивные Т-клетки, *T_cell:CD4+ effector memory* – $CD4^+$ эффекторные клетки памяти, *T_cell:CD8+ naive* – $CD8^+$ наивные Т-клетки, *T_cell:CD8+ effector memory*, *T_cell:CD4+* – $CD4^+$ Т-клетки, *T_cell:gamma-delta* – $\gamma\delta$ -Т-клетки, *T_cell:CD8+ CD8+* – $CD8^+$ Т-клетки, *T_cell:CD8+ effector memory_RA* – $CD8^+$ TEMRA, *T_cell:CD4+ central memory* – Т-хелперы центральной памяти А – Контрольная группа (*shCtl*), Б – Группа *shCdk5*.

Note: Quantitative comparison of expression levels of individual genes (*Gzmb*, *Gzma*, *Prf1*, *Mki67*) in specific T cell subsets between *shCtl* and *shCdk5* groups. *T_cell:CD8+ Central memory* – $CD8^+$ central memory T cells, *T_cell:CD4+ Naive* – $CD4^+$ naive T cells, *T_cell:CD4+ effector memory* – $CD4^+$ effector memory T

cells, T_cell:CD8⁺_naive – CD8⁺ naive T cells, T_cell:CD8⁺_effector_memory – CD8⁺ effector memory T cells, T_cell:CD4⁺ – CD4⁺ T cells, T_cell:gamma-delta – $\gamma\delta$ T cells, T_cell:CD8⁺ – CD8⁺ T cells, T_cell:CD8⁺_effector_memory_RA – CD8⁺ TEMRA, T_cell:CD4⁺_central_memory – CD4⁺ central memory T helper. A – Control group (shCtl), B – Group sh*Cdk5*.

Рисунок 3. Инфильтрация GZMB-положительными лимфоцитами метастатических очагов *in vivo*.

Figure 3. Infiltration of metastatic foci with GZMB-positive lymphocytes *in vivo*.



Примечание. (А) Репрезентативные изображения иммуногистохимического окрашивания срезов метастазов на GZMB в контрольной группе (shCtl, слева) и группе shCdk5 (справа). Масштабная линейка: 100 мкм. (Б) Количественное сравнение плотности GZMB⁺ лимфоцитов (клеток/мм²) между группами. Данные представлены в виде диаграммы «ящик с усами»; $p = 0.065$ (U-критерий Манна-Уитни).

Note. A – Representative images of immunohistochemical staining of metastasis sections for GZMB in the control group (shCtl, left) and shCdk5 group (right). Scale bar: 100 μm. B – Quantitative comparison of GZMB⁺ lymphocyte density (cells/mm²) between groups. Data are presented as box plot; $p = 0.065$ (Mann-Whitney U test).

Рисунок 4. Корреляционный анализ экспрессии *GZMB* в зависимости от уровня *CDK5* у пациентов с метастазами ГМ.

Figure 4. Correlation analysis of *GZMB* expression depending on *CDK5* level in patients with brain metastases.

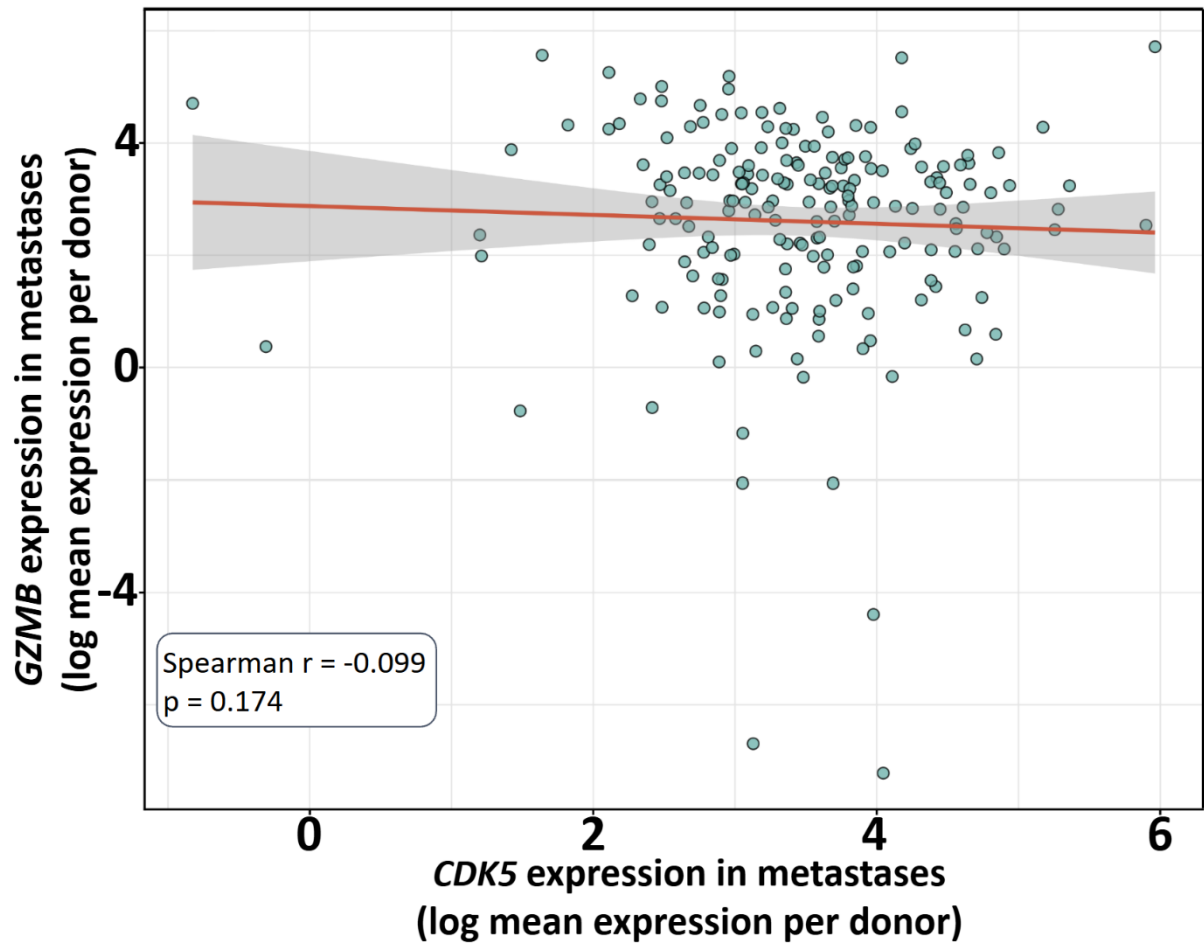
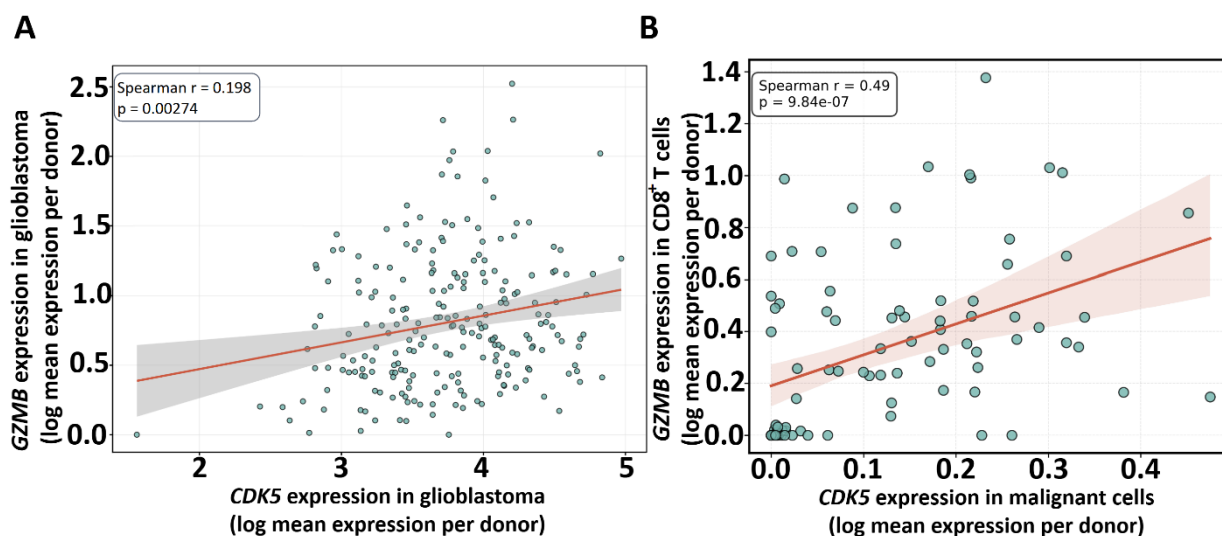


Рисунок 5. Корреляционный анализ экспрессии *GZMB* в зависимости от уровня *CDK5* в первичных ОЦНС.

Figure 5. Correlation analysis of *GZMB* expression depending on *CDK5* level in primary CNS tumors (glioblastoma).

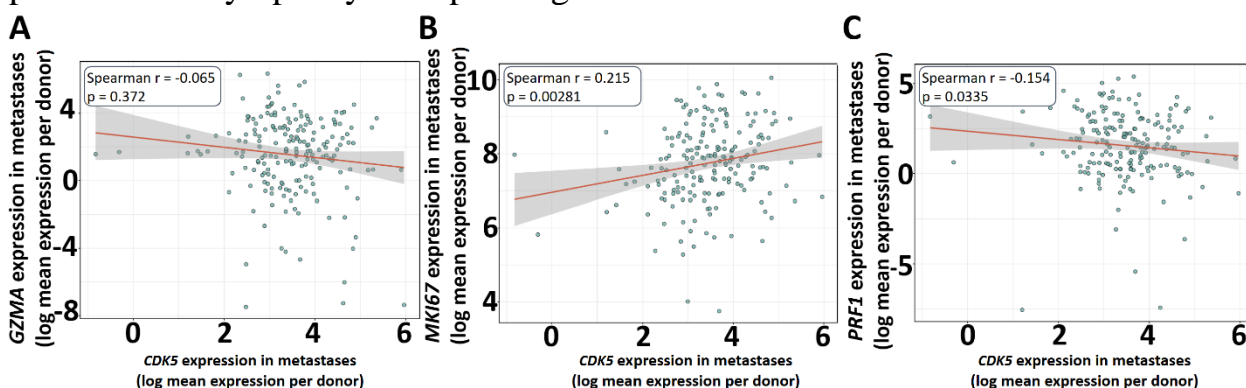


Примечание. А – Оценка корреляции исходя из целого транскриптома, представлены логарифмированные значения транскриптов на миллион (TPM). Б – Оценка корреляции уровня *GZMB* из транскриптома Т-клеток в зависимости от уровня *CDK5* из транскриптома опухолевых клеток (данные scRNA-seq).

Note: A – Correlation estimate based on the whole transcriptome, logarithmic transcripts per million (TPM) values are presented. B – Correlation estimate of *GZMB* level from the T-cell transcriptome depending on *CDK5* level from the tumor cell transcriptome (scRNA-seq data).

Рисунок 6. Корреляционный анализ экспрессии транскриптов основных эффекторных белков Т-лимфоцитов в зависимости от уровня *CDK5* в метастазах.

Figure 6. Correlation analysis of the expression of transcripts of the main effector proteins of T-lymphocytes depending on the level of *CDK5* in metastases.

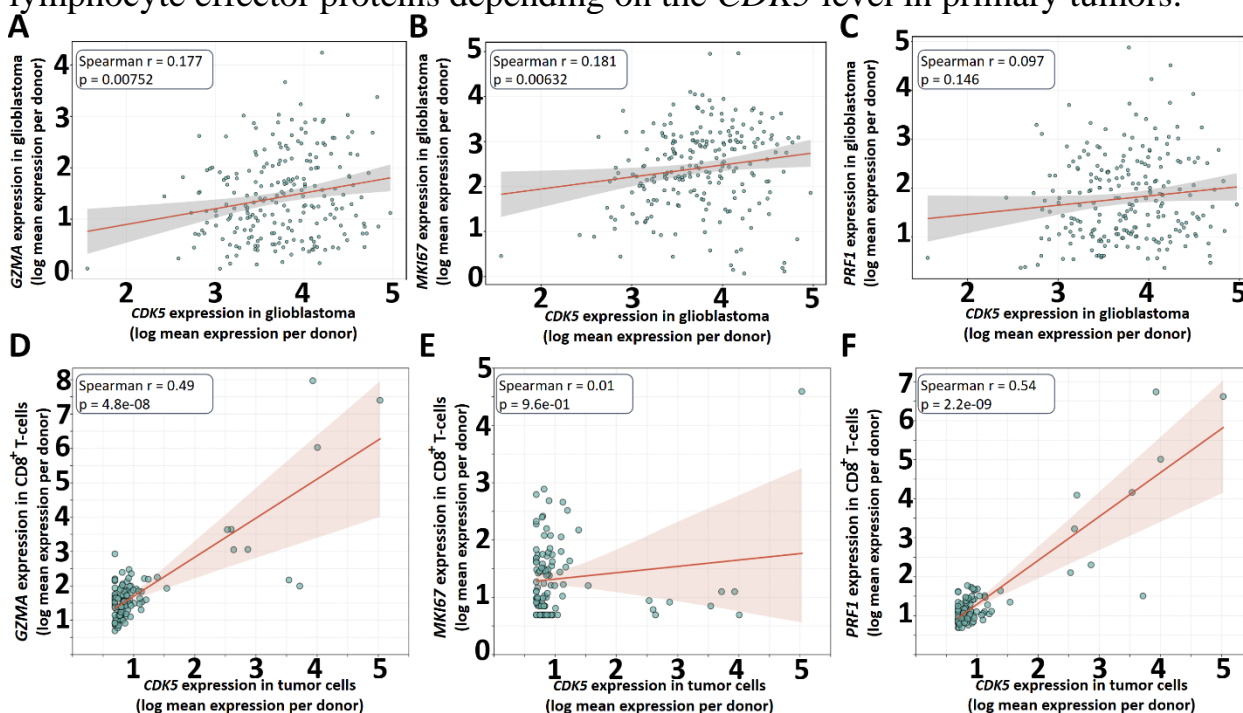


Примечание: Данные ТРМ взяты для результатов секвенирования bulk-RNA. А – Оценка корреляции между количеством транскриптов *GZMA* и *CDK5*. Б – Оценка корреляции между количеством транскриптов *MKI67* и *CDK5*. В – Оценка корреляции между количеством транскриптов *PRF1* и *CDK5*.

Note: TPM data are taken from bulk RNA sequencing results. A – Correlation between *GZMA* and *CDK5* transcript abundance. B – Correlation between *MKI67* and *CDK5* transcript abundance. C – Correlation between *PRF1* and *CDK5* transcript abundance.

Рисунок 7. Корреляционный анализ экспрессии транскриптов основных эффекторных белков Т-лимфоцитов в зависимости от уровня *CDK5* в первичных опухолях.

Figure 7. Correlation analysis of the expression of transcripts of major T-lymphocyte effector proteins depending on the *CDK5* level in primary tumors.

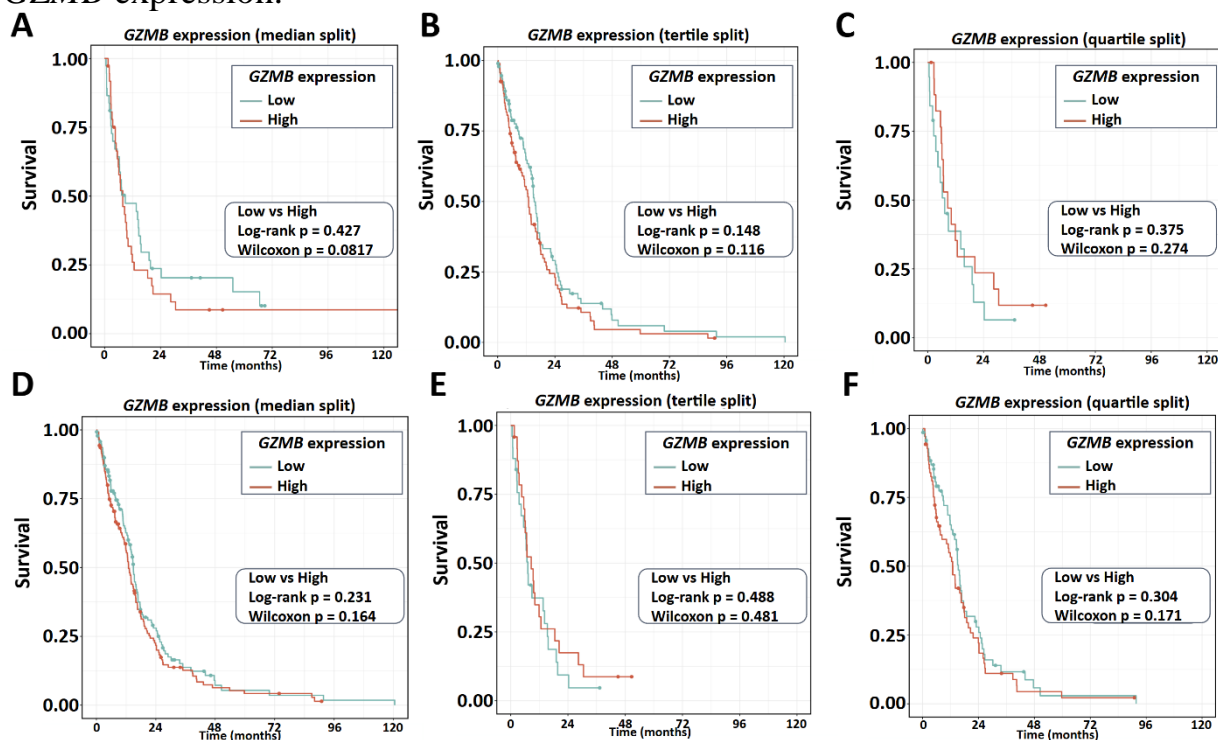


Примечание. А-В Данные TPM взяты для результатов секвенирования bulk-RNA. Г-Е Данные TPM взяты для scRNA-seq Т-лимфоцитов. А – Оценка корреляции между количеством транскриптов *GZMA* и *CDK5*. Б – Оценка корреляции между количеством транскриптов *MKI67* и *CDK5*. В – Оценка корреляции между количеством транскриптов *PRF1* и *CDK5*. Г – Оценка корреляции между количеством транскриптов *GZMA* и *CDK5* на основе данных scRNA-seq Т-лимфоцитов. Д – Оценка корреляции между количеством транскриптов *MKI67* и *CDK5* на основе данных scRNA-seq $CD8^+$ Т-лимфоцитов. Е – Оценка корреляции между количеством транскриптов *PRF1* и *CDK5* на основе данных scRNA-seq $CD8^+$ Т-лимфоцитов.

Note. A-C TPM data are taken from bulk RNA sequencing results. D-F TPM data are taken from T-lymphocyte scRNA-seq. A – Correlation analysis of *GZMA* and *CDK5* transcript amounts. B – Correlation analysis of *MKI67* and *CDK5* transcript amounts. C – Correlation analysis of *PRF1* and *CDK5* transcript amounts. D – Correlation analysis of *GZMA* and *CDK5* transcript amounts based on T-lymphocyte scRNA-seq data. E – Correlation analysis of *MKI67* and *CDK5* transcript amounts based on $CD8^+$ T-lymphocyte scRNA-seq data. F – Correlation analysis of *PRF1* and *CDK5* transcript amounts based on $CD8^+$ T-lymphocyte scRNA-seq data.

Рисунок 8. Сравнение показателей общей выживаемости пациентов при различных уровнях экспрессии *GZMB*.

Figure 8. Comparison of overall survival rates of patients with different levels of *GZMB* expression.

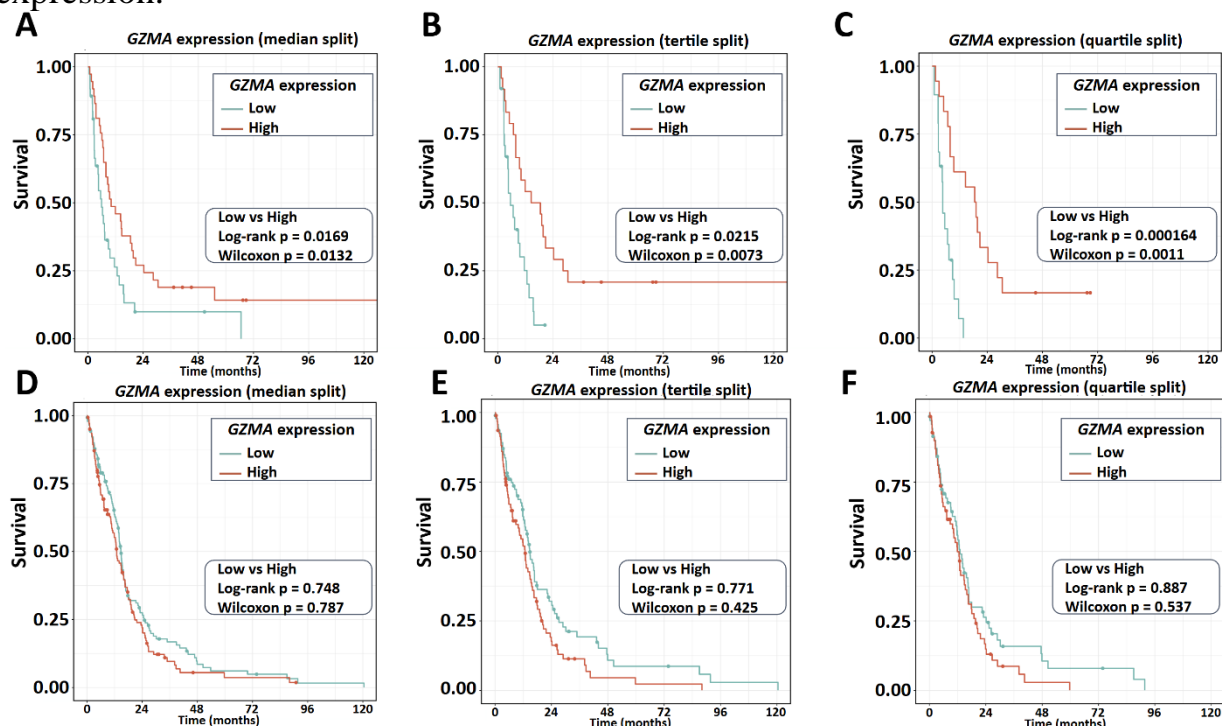


Примечание. А-В – данные для метастазов в мозг. Г-Е – данные для первичных опухолей (глиобластомы). А, Г – Разделение по медианному значению уровня экспрессии. Б, Д – Разделение по тертилям. В, Е – Разделение по квантилям.

Note. A-C – data for brain metastases. D-F – data for primary CNS tumors (glioblastoma). A, D – division by median expression level. B, E – division by tertiles. C, F – division by quartiles.

Рисунок 9. Сравнение показателей выживаемости пациентов при различных уровнях экспрессии *GZMA*.

Figure 9. Comparison of patient survival rates at different levels of *GZMA* expression.

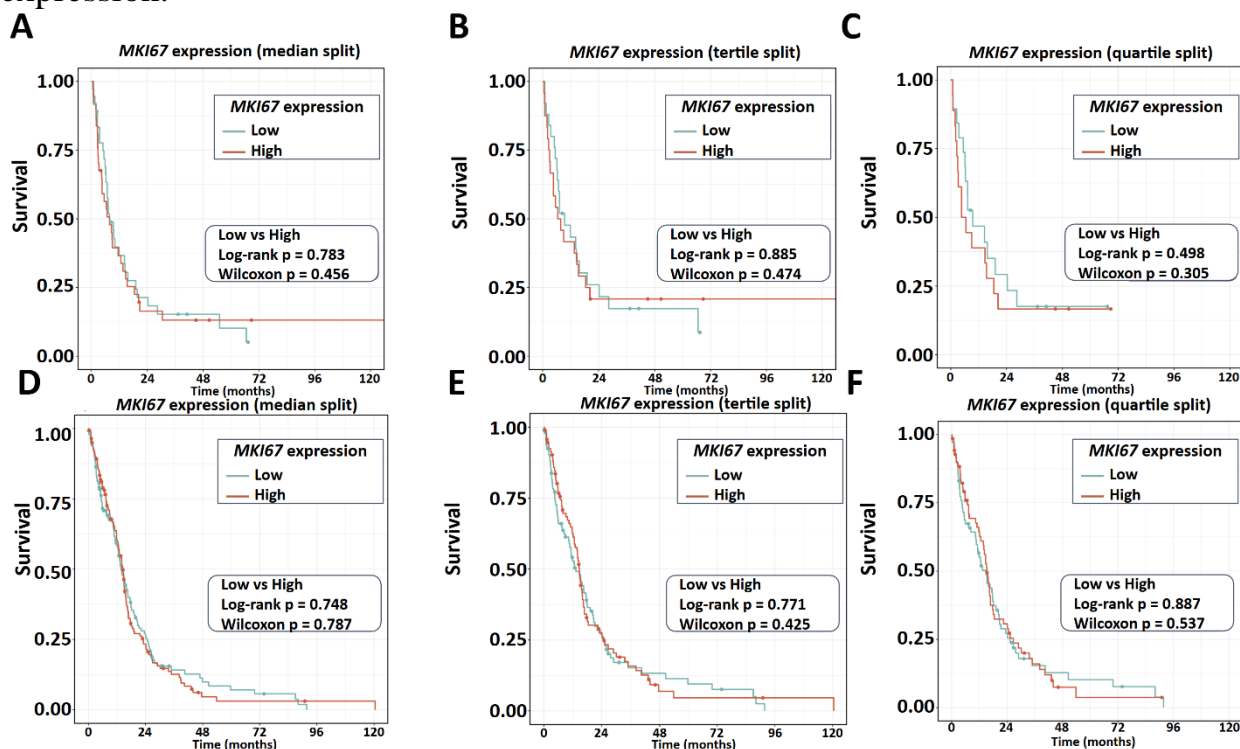


Примечание. А-В – данные для метастазов в ГМ. Г-Е – данные для первичных ОЦНС. А, Г – Разделение по медианному значению уровня экспрессии. Б, Д – Разделение по тертилям. В, Е – Разделение по квартилям.

Note. A-C – data for brain metastases. D-F – data for primary CNS tumors (glioblastoma). A, D – division by median expression level. B, E – division by tertiles. C, F – division by quartiles.

Рисунок 10. Сравнение показателей выживаемости пациентов при различных уровнях экспрессии *MKI67*.

Figure 10. Comparison of patient survival rates at different levels of *MKI67* expression.

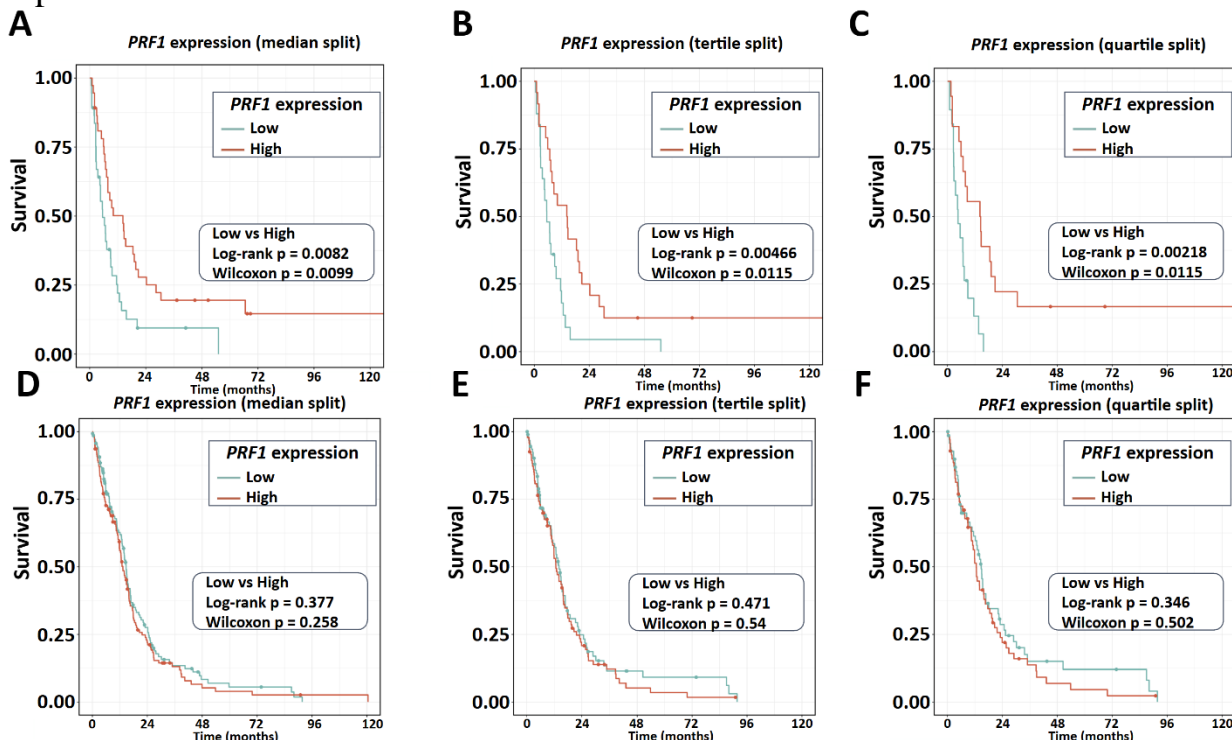


Примечание. А-В – данные для метастазов в ГМ. Г-Е – данные для первичных ОЦНС. А, Г – Разделение по медианному значению уровня экспрессии. Б, Д – Разделение по тертилям. В, Е – Разделение по квартилям.

Note. A-C – data for brain metastases. D-F – data for primary CNS tumors (glioblastoma). A, D – division by median expression level. B, E – division by tertiles. C, F – division by quartiles.

Рисунок 11. Сравнение показателей выживаемости пациентов при различных уровнях экспрессии *PRF1*.

Figure 11. Comparison of patient survival rates at different levels of *PRF1* expression.



Примечание. А-В – данные для метастазов в ГМ. Г-Е – данные для глиобластомы. А, Г – Разделение по медианному значению уровня экспрессии. Б, Д – Разделение по тертилям. В, Е – Разделение по квартилям.

Note. А-С – data for brain metastases. D-F – data for primary CNS tumors (glioblastoma). А, D – division by median expression level. В, Е – division by tertiles. С, F – division by quartiles.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Южалин Арсений Евгеньевич, доктор философии PhD, Руководитель научной группы III категории Научного центра трансляционной медицины Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус»;

Адрес: 354340, Краснодарский край, пгт. Сириус, Олимпийский пр-т, д. 1;

Телефон: +7(918) 234 18 51;

E-mail: yuzhalin.ae@talantiuspeh.ru

Arseniy E. Yuzhalin, Doctor of Philosophy (PhD), Principal Investigator of Research center for translational medicine. Sirius University of Science and Technology;

Address: Russia, 354340, Krasnodar Krai, Sirius urban-type settlement, Olimpiyskiy Avenue, building 1;

telephone: +7(918) 234 18 51;

E-mail: yuzhalin.ae@talantiuspeh.ru

Блок 2. Информация об авторах

Илюшин Данила Романович, магистр биологии, младший научный сотрудник Научного центра трансляционной медицины Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус».

Danila R. Piushin, master of biology, junior researcher, Research center for translational medicine, Sirius University of Science and Technology.

Арсентьев Кирилл Андреевич, магистр биологии, младший научный сотрудник Научного центра трансляционной медицины Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус».

Kirill A. Arsentiev, master of biology, junior researcher, Research center for translational medicine, Sirius University of Science and Technology.

Шардина Ксения Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Научного центра трансляционной медицины Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус». Россия, 354340, Краснодарский край, пгт. Сириус, Олимпийский пр-т, д. 1.

Kseniya Yu. Shardina, Doctor of Philosophy (PhD), senior researcher, Research center for translational medicine. Sirius University of Science and Technology.

Блок 3. Метаданные статьи

АНАЛИЗ ЭФФЕКТА НОКДАУНА *Cdk5* НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ Т-КЛЕТОЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ

ANALYSIS OF THE EFFECT OF *Cdk5* KNOCKDOWN ON THE CYTOTOXIC POTENTIAL OF T-CELL SUBPOPULATIONS

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ЭФФЕКТ НОКДАУНА *CDK5*
CDK5 KNOCKDOWN EFFECT

Ключевые слова: циклинзависимая киназа 5, опухоли центральной нервной системы, Т-клеточный ответ, гранзим В, корреляционный анализ, выживаемость.

Keywords: cyclin-dependent kinase 5, central nervous system tumors, T-cell response, granzyme B, correlation analysis, survival probability.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 10,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 11.

25.12.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1.	Ostrom Q. T., Francis S. S., Barnholtz-Sloan J. S. Epidemiology of Brain and Other CNS Tumors. <i>Current Neurology and Neuroscience Reports</i> , 2021, Vol. 21, no. 12, p. 68.	-	URL: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8613072/ DOI: 10.1007/s11910-021-01152-9
2	Buckner J. C., Brown P. D., O'Neill B. P., Meyer F. B., Wetmore C. J., Uhm J. H. Central Nervous System Tumors. <i>Mayo Clinic Proceedings</i> , 2007, Vol. 82, no. 10, pp. 1271-1286.	-	URL: https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196(11)61400-6/abstract DOI: 10.4065/82.10.1271
3	Wu P., Gao W., Su M., Nice E. C., Zhang W., Lin J., Xie N. Adaptive Mechanisms of Tumor Therapy Resistance Driven by Tumor Microenvironment. <i>Frontiers in Cell and Developmental Biology</i> , 2021, Vol. 9, pp. 641469.	-	URL: https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2021.641469/full DOI: 10.3389/fcell.2021.641469
4	Lustberg M. B., Kuderer N. M., Desai A., Bergerot C., Lyman G. H. Mitigating long-term and delayed adverse events associated	-	URL: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10211308/

	with cancer treatment: implications for survivorship. <i>Nature Reviews Clinical Oncology</i> , 2023, Vol. 20, no. 8, pp. 527-542.		DOI: 10.1038/s41571-023-00776-9
5	Wagland R., Richardson A., Armes J., Hankins M., Lennan E., Griffiths P. Treatment-related problems experienced by cancer patients undergoing chemotherapy: a scoping review. <i>European Journal of Cancer Care</i> , 2015, Vol. 24, no. 5, pp. 605-617.	-	URL: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ecc.12246 DOI: 10.1111/ecc.12246
6	Lei Z. N., Tian Q., Teng Q. X., Wurlpel J. N. D., Zeng L., Pan Y., Chen Z. S. Understanding and targeting resistance mechanisms in cancer. <i>MedComm</i> , 2023, Vol. 4, no. 3, p. e265.	-	URL: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10203373/ DOI: 10.1002/mco2.265
7	Fares J., Fares M. Y, Khachfe H. H., Slahab H. A., Fares Y. Molecular principles of metastasis. <i>Signal Transduction and Targeted Therapy</i> , 2020, Vol. 5, no. 1, p. 28.	-	URL: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7067809/ DOI: 10.1038/s41392-020-0134-x
8	Gerstberger S., Jiang Q., Ganesh K. Metastasis. <i>Cell</i> , 2023, Vol. 186, no. 8, pp. 1564-1579.	-	URL: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10511214/ DOI: 10.1016/j.cell.2023.03.003

9	Steeg P. Targeting metastasis. <i>Nat Rev Cancer</i> , 2016, Vol. 16, pp. 201-218.	-	URL: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7055530/ DOI: 10.1038/nrc.2016.25
10	Galassi C., Chan T. A., Vitale I., Galluzzi L. The hallmarks of cancer immune evasion. <i>Cancer Cell</i> , 2024, Vol. 42, no. 11, pp. 1825-1863.	-	URL: https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108(24)00358-1?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1535610824003581%3Fshowall%3Dtrue DOI: 10.1016/j.ccell.2024.09.010
11	Yuzhalin A. E., Lowery F. J., Saito Y., Yuan X., Yao J., Duan Y., Ding J., Acharya S., Zhang C., Fajardo A., Chen H. N., Wei Y., Sun Y., Zhang L., Xiao Y., Li P., Lorenzi P. L., Huse J. T., Fan H., Zhao Z., Hung M. C., Yu D. Astrocyte-induced <i>Cdk5</i> expedites breast cancer brain metastasis by suppressing MHC-I expression to evade immune recognition. <i>Nature Cell Biology</i> , 2024, Vol. 26.,no. 10, pp. 1773-1789.	-	URL: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11676029/ DOI: 10.1038/s41556-024-01509-5

12	Dorand R. D., Nthale J., Myers J. T., Barkauskas D. S., Avril S., Chirieleison S. M., Pareek T. K., Abbott D. W., Stearns D. S., Letterio J. J., Huang A. Y., Petrosiute A. <i>Cdk5</i> disruption attenuates tumor PD-L1 expression and promotes antitumor immunity. <i>Science</i> , 2016, Vol. 353, no. 6297, pp. 399-403.	-	URL: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5051664/ DOI: 10.1126/science.aae0477
13	Hsu F. N., Chen M. C., Lin K. C., Peng Y. T., Li P. C. Lin E., Chiang M. C., Hsieh J. T., Lin H. Cyclin-dependent kinase 5 modulates STAT3 and androgen receptor activation through phosphorylation of Ser ⁷²⁷ on STAT3 in prostate cancer cells. <i>American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism</i> , 2013, Vol. 305, no. 8, pp. 975-986.	-	URL: https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpendo.00615.2012?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org DOI: 10.1152/ajpendo.00615.2012
14	Wang J., Zhang C., Jiang T., He Y. Wu Y., Zhou D., Yan J., Zhou Y. CDK5: Insights into its roles in diseases. <i>Molecular Biology Reports</i> , 2025, Vol. 52, no. 1, p. 145.	-	URL: https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-025-10253-4 DOI: 10.1007/s11033-025-10253-4
15	Ruiz de Porras V., Bystrup S., Cabrero-de Las Heras S., Musulén E., Palomero L.,	-	URL: https://pmc.ncbi.nlm.nih.g

	Alonso M. H., Nieto R., Arango D., Moreno V., Queralt C., Manzano J. L., Layos L., Bugés C., Martinez-Balibrea E. Tumor Expression of Cyclin-Dependent Kinase 5 (<i>Cdk5</i>) Is a Prognostic Biomarker and Predicts Outcome of Oxaliplatin-Treated Metastatic Colorectal Cancer Patients. <i>Cancers</i> , 2019, Vol. 11, no. 10, p. 1540.		ov/articles/PMC6826373/ DOI: 10.3390/cancers11101540
16	Fischer G. M., Jalali A., Kircher D. A., Lee W. C., McQuade J. L., Haydu L. E., Joon A. Y., Reuben A., de Macedo M. P., Carapeto F. C. L., Yang C., Srivastava A., Ambati C. R., Sreekumar A., Hudgens C. W., Knighton B., Deng W., Ferguson S. D., Tawbi H. A., Glitza I. C., Gershenwald J. E., Vashisht Gopal Y. N., Hwu P., Huse J. T., Wargo J. A., Futreal P. A., Putluri N., Lazar A. J., DeBerardinis R. J., Marszalek J. R., Zhang J., Holmen S. L., Tetzlaff M. T., Davies M. A. Molecular Profiling Reveals Unique Immune and Metabolic Features of Melanoma Brain Metastases. <i>Cancer Discovery</i> , 2019, Vol. 9, no. 5, pp. 628-645.	-	URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6497554/ DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-1489
17	Guan X., Guo H., Guo Y., Han Q., Li Z., Zhang C. Perforin 1 in Cancer: Mechanisms,	-	URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11352983/

	Therapy, and Outlook. <i>Biomolecules</i> , 2024, Vol. 14, no. 8, p. 910.		DOI: 10.3390/biom14080910
18	Lu L., Bai Y., Wang Z. Elevated T cell activation score is associated with improved survival of breast cancer. <i>Breast Cancer Research and Treatment</i> , 2017, Vol. 164, no. 3, pp. 689-696.	-	URL: https://link.springer.com/article/10.1007/s10549-017-4281-x DOI: 10.1007/s10549-017-4281-x
19	Agioti S., Zaravinos A. Immune Cytolytic Activity and Strategies for Therapeutic Treatment. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 2024, Vol. 25, no. 7, p. 3624.	-	URL: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11011457/ DOI: 10.3390/ijms25073624
20	Wang B., Hu S., Fu X., Li L. CD4 ⁺ Cytotoxic T Lymphocytes in Cancer Immunity and Immunotherapy. <i>Advanced Biology</i> , 2023, Vol. 7, no. 4, p. 2200169.	-	URL: https://advanced.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adbi.202200169 DOI: 10.1002/adbi.202200169
21	Lin Y. C., Wu C. H., Chen P. J., Huang C. H., Yang C. K., Dutta A., Huang C. T., Lin C. Y., Murine cytotoxic CD4 ⁺ T cells in the tumor microenvironment are at a hyper-maturation stage of Th1 CD4 ⁺ T cells sustained by IL-12. <i>International Immunology</i> , 2023, Vol. 35, no. 8, pp. 387-400.	-	URL: https://academic.oup.com/intimm/article/35/8/387/7171918?login=false DOI: 10.1093/intimm/dxad015

22	Wang M., Windgassen D., Papoutsakis E. T. Comparative analysis of transcriptional profiling of CD3 ⁺ , CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells identifies novel immune response players in T-Cell activation. <i>BMC Genomics</i> , 2008, Vol. 9, no. 1, p. 225.	-	URL: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2396644/ DOI: 10.1186/1471-2164-9-225
23	Zhang C., Li S., Shen L., Teng X., Xiao Y., Yang W., Lu Z. Single-cell sequencing of tumour infiltrating T cells efficiently identifies tumour-specific T cell receptors based on the T cell activation score. <i>Cancer Immunology, Immunotherapy</i> , 2024, Vol. 73, no. 7, p. 123.	-	URL: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11087383/ DOI: 10.1007/s00262-024-03710-9.
24	Coussens L. M., Werb Z. Inflammation and cancer. <i>Nature</i> , 2002, Vol. 420, no. 6917, pp. 860-867.	-	URL: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2803035/ DOI: 10.1038/nature01322