

# ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ЭКЗОГЕННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И МЕХАНИЗМЫ ЗАПУСКА ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ В ОТВЕТ НА ИНТЕРНАЛИЗАЦИЮ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК

Алямкина Е.А.<sup>1</sup>, Долгова Е.В.<sup>1</sup>, Проскурина А.С.<sup>1</sup>, Рогачев В.А.<sup>1</sup>,  
Останин А.А.<sup>2</sup>, Черных Е.Р.<sup>2</sup>, Богачев С.С.<sup>1,3</sup>, Шурдов М.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт цитологии и генетики» СО РАН, г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> ООО «Панаген», г. Горно-Алтайск, Россия

**Резюме.** В защитной системе клетки существуют специфические механизмы, детектирующие проникновение чужеродных молекул, так называемых патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП), в ее внутреннее пространство. Распознавание ПАМП происходит или с участием Toll-like рецепторов, или сопряжено с активностью цитозольных сенсоров. В последнее время большое внимание уделяется изучению процесса детекции нуклеиновых кислот, доставленных в цитозоль эукариотической клетки. К настоящему времени идентифицированы такие внутриклеточные сенсоры двуцепочечной ДНК, как STING, DAI, семейство NOD-like белков, RLH-геликазы, белки семейства HIN-200. Одни из этих факторов непосредственно взаимодействуют с двуцепочечной ДНК, другие являются охарактеризованными посредниками в передаче сигнала с неизвестного ДНК-сенсора. Результатом активации каскада событий, запускаемых цитозольной двуцепочечной ДНК, является индукция ядерных транскрипционных факторов NF-κB и IRF3/IRF7 и усиление продукции интерферона-бета, а также процессинг предшественников провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-18 путем формирования инфламасом. В настоящем обзоре обобщена информация, характеризующая пути реализации сигнала от момента определения внутриклеточной двуцепочечной ДНК до формирования клеточного иммунного ответа.

**Ключевые слова:** патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП), двуцепочечная ДНК (дцДНК), цитозольный сенсор, интерферон-бета (IFNβ), инфламасома

## Адрес для переписки:

Богачев Сергей Станиславович  
д.б.н., заведующий лабораторией  
индуцированных клеточных процессов  
ФГБУН «Институт цитологии  
и генетики» СО РАН  
630090, Россия, г. Новосибирск,  
пр. акад. Лаврентьева, 10.  
Тел.: 8 (383) 363-49-18, доб. 1017.  
E-mail: labmolbiol@mail.ru

## Авторы:

Алямкина Е.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБУН «Институт цитологии и генетики» СО РАН, г. Новосибирск  
Долгова Е.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБУН «Институт цитологии и генетики» СО РАН, г. Новосибирск  
Проскурина А.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБУН «Институт цитологии и генетики» СО РАН, г. Новосибирск  
Рогачев В.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБУН «Институт цитологии и генетики» СО РАН, г. Новосибирск  
Останин А.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск  
Черных Е.Р. — д.м.н., профессор, заместитель директора по науке ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск  
Богачев С.С. — д.б.н., заведующий лабораторией индуцированных клеточных процессов ФГБУН «Институт цитологии и генетики» СО РАН, г. Новосибирск  
Шурдов М.А. — к.б.н., директор ООО «Панаген», г. Горно-Алтайск

Поступила 22.02.2013

Принята к печати 09.04.2013

# INTRACELLULAR SYSTEMS FOR DETECTION OF EXOGENOUS NUCLEIC ACIDS AND TRIGGERING MECHANISMS OF IMMUNE RESPONSE TO DNA INTERNALIZATION

Alyamkina E.A.<sup>a</sup>, Dolgova E.V.<sup>a</sup>, Proskurina A.S.<sup>a</sup>, Rogachev V.A.<sup>a</sup>, Ostanin A.A.<sup>b</sup>, Chernykh E.R.<sup>b</sup>, Bogachev S.S.<sup>a,c</sup>, Shurdov M.A.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>c</sup> LLC "PANAGEN", Gorno-Altai, Russian Federation

**Abstract.** There are some specific mechanisms in cell that detect the invasion into the cell of any foreign molecules, so-called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). The recognition of these PAMPs is realized by Toll-like receptors or is due to the cytosolic sensors action. In recent years much attention is directed to the investigation of foreign nucleic acids sensing and detection in cell. Nowadays some sensors of double-stranded DNA, such as STING, DAI, members of NOD-like protein family, RIG-like helicases, proteins of HIN-200 family are identified. Some of sensors interact with double-stranded DNA directly. The others are characterized as mediators of signal transduction from unknown DNA-sensor in the series of following molecular events. Induction of nuclear transcription factors NF- $\kappa$ B and IRF3/IRF7 to produce IFN $\beta$  or processing of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 by means of inflammasome formation is a result of activation of cascade events induced by cytosolic DNA. In the review we combine information concerning signaling pathways characterized sensing of intracellular double-stranded DNA that results in the development of the cellular immune response. (*Med. Immunol.*, 2013, vol. 15, N 5, pp 413-430)

**Keywords:** pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), double-stranded DNA (dsDNA), cytosolic sensor, interferon-beta (IFN $\beta$ ), inflammasome

## Address for correspondence:

Bogachev Sergey S.  
PhD, MD, Chief, Laboratory of Induced Cellular Processes, Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch 630090, Russian Federation, Novosibirsk, Lavrentyeva pr., 10.  
Phone: 7 (383) 363-49-18, add. 1017.  
E-mail: labmolbiol@mail.ru

## Authors:

Alyamkina E.A., PhD (Biology), Laboratory of Induced Cellular Processes, Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk  
Dolgova E.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Induced Cellular Processes, Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk  
Proskurina A.S., PhD (Biology), Laboratory of Induced Cellular Processes, Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk  
Rogachev V.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Induced Cellular Processes, Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk  
Ostanin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk  
Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Research, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk  
Bogachev S.S., PhD, MD (Biology), Chief, Laboratory of Induced Cellular Processes, Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk  
Shurdov M.A., PhD (Biology), Director, LLC "PANAGEN", Gorno-Altai

Received 22.02.2013

Accepted 09.04.2013

## Введение

Как известно, врожденный иммунный ответ обеспечивает защиту организма против чужеродных интервентов. Детекцию различных патогенных компонент обеспечивают так называемые паттерн-распознающие рецепторы (PPR), активирующие врожденный иммунитет и запускающие развитие адаптивного иммунного ответа [9, 76]. PPR включают семейство хорошо описанных Toll-like рецепторов (TLRs), которые распознают различные патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП); семейство цитоплазматических Nod-like рецепторов (NLRs), активирующихся при взаимодействии с двуцепочечной ДНК (дцДНК) и формирующих инфламмосомы (NOD, NALP и др.); семейство RIG-like геликаз (RLH), RIG-1 и MDA5, распознающих РНК с выступающим 5'-трифосфатом; семейство HIN-200 белков (AIM2, IFI16) [9]. К PPR относятся также и другие факторы клетки, являющиеся сенсорами цитозольной дцДНК, такие как STING, DAI, а также группа недавно охарактеризованных в этом ключе белков HMGB [89].

В последние годы все больше внимания уделяется изучению сигнальных путей, опосредующих запуск иммунного ответа при проникновении в клетку нуклеиновых кислот экстраклеточной локализации (вирусной РНК, вирусной и бактериальной ДНК, разных типов синтетических олигонуклеотидов, геномной ДНК) [9, 79]. Основным результатом распознавания ПАМП является активация клеток врожденного иммунитета, усиление продукции интерферонов I типа (в основном IFN $\beta$ ) и различных провоспалительных цитокинов [95]. В результате такой активации индуцируется процесс элиминации проникших в организм патогенов и регулируется развитие адаптивного иммунного ответа.

Индукция экспрессии интерферонов I типа представляет собой первоочередное событие в иммунном ответе и происходит двумя последовательными каскадами [27]. Первоначальный сигнал инициируется при распознавании компоненты патогена каким-либо из упомянутых PPR, что приводит к активации транскрипционных факторов (IRF, NF- $\kappa$ B) и запуску продукции интерферонов I типа. Вторичный сигнал связан с усилением экспрессии рецепторов к интерферонам I типа, с которыми взаимодействуют синтезированные de novo молекулы интерферонов. В результате, через ауто- и паракринные механизмы происходит активация антиген-презентирующих клеток, в первую очередь дендритных клеток (ДК). ДК, активированные интерфероном, усиливают свою функциональную активность, эффективно стимулируют различные субпопуляции Т-клеток (наивные и Т-клетки памяти, цитоток-

сические Т-лимфоциты) и, таким образом, обеспечивают инициацию и формирование антиген-специфического иммунного ответа [74, 95].

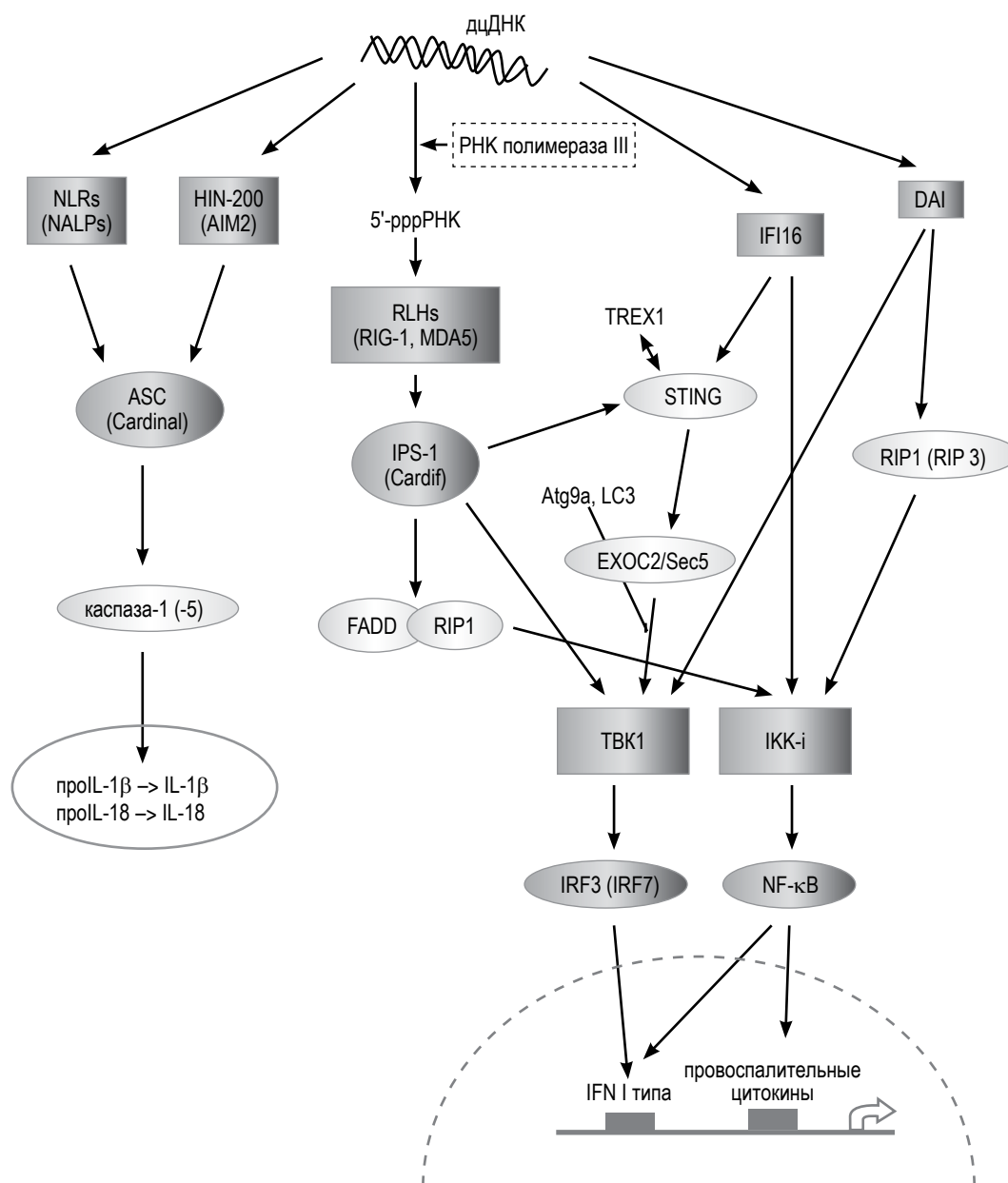
В настоящее время появилась возможность структурировать имеющуюся в литературе информацию, характеризующую механизмы запуска иммунного ответа на свободные нуклеиновые кислоты, выступающие в качестве ПАМП, и дать характеристику сенсорам указанных нуклеиновых кислот и путей проведения сигнала в направлении синтеза интерферонов I типа/цитокинов. В обзоре дается характеристика путей трансдукции специфического, направленного на активацию транскрипционных факторов, запускающих синтез провоспалительных цитокинов, сигнала в ответ на интернализацию экстраклеточных нуклеиновых кислот (дцДНК или дцРНК) в компартментах эукариотической клетки. В заключительной части обзора рассматриваются возможные причины существования двух типов сенсорных систем на дцДНК.

### Сенсоры и внутриклеточные пути трансдукции сигнала цитозольной ДНК

Реакция клетки на интернализацию экстраклеточных нуклеиновых кислот начинается в процессе преодоления этими ПАМП цитоплазматической мембраны. Оказавшись в цитоплазме клетки, дцДНК или РНК молекулы опознаются соответствующими сенсорными факторами. В зависимости от структуры ПАМП и реагирующего на него сенсора активируется тот или иной специфический путь передачи сигнала, индуцирующего продукцию интерферонов I типа и провоспалительных цитокинов. Таким образом, механизм запуска синтеза иммунных медиаторов одинаков для всех вариантов путей передачи сигнала и характеризуется активацией эффекторных киназ, ТВК1 и ИКК [30, 59]. В настоящее время описаны два пути, характеризующихся, в одном случае, активацией транскрипции генов интерферонов/цитокинов и, в другом случае, процессингом уже существующих незрелых форм иммунных медиаторов путем формирования инфламмосом (рис. 1).

Известны, в частности, следующие сенсоры дцДНК и активируемые ими пути трансдукции сигнала. Молекулы АТ-богатой дцДНК в цитозоле обнаруживаются РНК-полимеразой III. Полученный в результате синтеза с этой дцДНК транскрипт, содержащий 5'-трифосфат, активирует RLH-опосредованный путь индукции экспрессии генов IFN $\beta$  и комплекса провоспалительных цитокинов [10, 15, 36].

Цитозольный сенсор DAI необходим для распознавания цитозольной ДНК в В-форме определенного размера и нуклеотидного состава (интерферон-стимулирующая ДНК [ISD] или дцДНК



**Рисунок 1. Схема основных путей запуска иммунного ответа клетки, индуцируемых цитозольными нуклеиновыми кислотами**

**Примечание.** NLR – семейство NOD-like рецепторных белков, в том числе белки подсемейства NALPs; HIN-200 – семейство белков, содержащих HIN-200 домен, AIM2 (absent in melanoma 2) – представитель семейства; ASC (Cardinal) – адаптерная молекула; RLHs – семейство RIG-like геликаз, представители RIG-1, MDA5; IPS-1 (Cardif), FADD, RIP1 – адаптерные молекулы; IFI16 – белок семейства HIN-200, непосредственно взаимодействующий с дцДНК; DAI (DNA-dependent activator of IRFs) (ZBP1) – ДНК-зависимый активатор интерферон-регулирующих факторов; STING (stimulator of IFN genes) – цитоплазматический фактор распознавания экзогенной дцДНК; TREX1 – 3'-5' ДНК экзонуклеаза, регулирующая гомеостаз нуклеиновых кислот в клетке; Atg9 и LC3 – аутофагосомальные белки, контролирующие правильную ассоциацию TBK1 и STING в клетке; TBK1 (TANK-binding kinase 1) – киназа, активирующая ядерный фактор NF-κB; IKK (IκB-kinases) – IκB-киназы, способствующие развитию противовоспалительного иммунного ответа; IRF (IFN-regulating factor) – интерферон-регулирующий фактор; NF-κB (nuclear factor kappa B) – ядерный транскрипционный фактор.

длиной не менее 45 п.о., не содержащая CpG-мотивов) и запуска DAI-опосредованного пути активации синтеза интерферонов/цитокинов [49, 76, 87].

Описано семейство рецепторов, содержащих HIN-200 домен (семейство HIN-200,

или PYHIN), который непосредственно связывается с дцДНК, что приводит к олигомеризации сенсорной молекулы и активации трансдуцирующего пути [9, 84], как это показано, например, для белка семейства HIN-200, IFI16. После распознавания и активации цитозольной ДНК IFI16

запускает STING-опосредованный путь синтеза  $IFN\beta$  и провоспалительных цитокинов. Установлено, что в зависимости от структуры конкретной молекулы-«раздражителя» происходит или транскрипция генов иммунных медиаторов, или формируются инфламмосомы, необходимые для процессинга и созревания молекул провоспалительных цитокинов [33, 82, 84].

Другим известным сенсором цитозольной ДНК является фактор AIM2 (absent in melanoma 2), также относящийся к семейству интерферон-индуцибельных HIN-200 рецепторов. Активность AIM2 приводит к формированию инфламмосом и процессингу молекул провоспалительных цитокинов [10, 24, 84].

Охарактеризован еще один сигнальный путь, индуцирующий формирование инфламмосом. Это NLR-опосредованный путь передачи сигнала [58]. Сенсорами, индуцирующими NLR-путь трансдукции сигнала, является группа NOD-like рецепторов (NLRs). Одним из хорошо изученных NOD-like рецепторов является фактор NALP3. NALP3, совместно с адаптерной молекулой ASC и каспазами-1 и -5, формирует инфламмосому [54, 58]. Результатом активации NALP3 является процессинг провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-18.

#### **Механизм запуска иммунного ответа, связанного с внутриклеточной интернализацией молекул нуклеиновых кислот**

В организме в постоянном обороте находятся многочисленные вещества и метаболиты, являющиеся продуктами жизнедеятельности как эндогенной, так и экзогенной природы. Многие из этих молекулярных компонентов проявляют свойства ПАМП и могут выступать в качестве индукторов иммунного ответа. Нуклеиновые кислоты не являются исключением. Результаты исследований последних лет свидетельствуют о том, что практически любые типы нуклеиновых кислот и их формы способны к активации иммунного ответа в организме высших эукариот [7, 19, 42, 95]. Это молекулы одно- и двуцепочечных РНК [7, 19, 26], олигонуклеотиды, содержащие CpG-мотивы или имеющие модифицированный сахаро-фосфатный остов [44, 45], молекулы дцДНК, как в ассоциации с белками, так и без белков [51, 72, 75], ДНК в форме нуклеосом [18, 92]. В настоящем обзоре основное внимание будет уделено активирующему действию молекул дцДНК.

Инициация иммунного ответа на цитозольную дцДНК может реализовываться через различные внутриклеточные сигнальные пути, общим проявлением которых является активация специфических киназ, TBK1-киназы и IKK-киназы, и последующее фосфорилирование ими следующих по иерархической лестнице субстра-

тов, что приводит к усилению секреции интерферонов и провоспалительных цитокинов.

Хорошо изучен процесс активации иммунного ответа олигонуклеотидами, содержащими CpG-мотивы или имеющими модифицированный сахаро-фосфатный остов. Известно, что неметилированная ДНК, содержащая палиндромы CG, является одним из основных ПАМП, активирующих ДК [1, 41, 57]. В опознавании и проведении сигнала основная роль принадлежит семейству Toll-like рецепторов [6, 57]. TLRs являются трансмембранными белками и содержат несколько специфических доменов: эктодомен, несущий лейцин-богатые повторы, через которые происходит узнавание ПАМП, трансмембранный домен и цитозольный TIR домен (Toll-IL-1-receptor), который участвует в активации цепи дальнейших сигнальных событий. TLRs экспрессируются либо на цитоплазматической мембране (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 и TLR6), либо ассоциированы с внутриклеточными везикулами (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 и TLR13), к которым относятся эндоплазматический ретикулум, лизосомы, эндосомы и эндолизосомы [11].

К настоящему моменту известно 12 функциональных Toll-like рецепторов [38], каждый из которых детектирует определенный ПАМП вирусов, бактерий, микобактерий, грибов или паразитов. К ним относятся липопотеины и пептидогликаны, распознаваемые TLR1, TLR2 и TLR6, дцРНК (TLR3), LPS (TLR4), флагеллин (TLR5), оцРНК (TLR7 и TLR8), CpG-ДНК (TLR9) [6]. При распознавании соответствующих ПАМП активируется процесс передачи сигнала, в который TLRs вовлекают специфический набор адаптерных молекул (MyD88, TRIF), также содержащих TIR домены, взаимодействующие с TIR доменом TLR-рецептора. Сформированный комплекс индуцирует каскад событий, приводящих к секреции провоспалительных цитокинов, интерферонов I типа, хемокинов и других иммуоактивных медиаторов [37].

Рецептор TLR9, находящийся в большом количестве в эндосомальных компартментах ДК, связывает CG последовательности и запускает Th1-путь иммунного ответа [38]. Взаимодействие поглощенной ДНК с TLR9 приводит к стремительной генерации реактивных форм кислорода и NO-синтазы [94]. Передача сигнала внутрь клетки осуществляется с использованием TIR домена TLR9 и TIR домена одного из адаптерных белков, главным образом MyD88, и дальнейшим участием IRAK-киназы и белков семейства TRAF. В конце сигнальной цепи происходит активация киназ IKK или TBK1, которые фосфорилируют транскрипционные факторы NF- $\kappa$ B, IRF, AP1 (activator protein-1), что непосредствен-

но приводит к экспрессии генов провоспалительных цитокинов, интерферонов I типа, их секреции и развитию иммунного ответа [1, 2, 38, 84].

Описаны основные метаболические пути, осуществляющие обнаружение и трансдукцию сигнала при взаимодействии ДК с молекулами экзогенной ДНК. К ним относятся NLR-сигнальный путь, STING-опосредованная индукция иммунного ответа; RLH-зависимый сигнальный путь, опосредованный активностью РНК-полимеразы III. Также в обнаружении сигнала участвуют специфические рецепторы DAI и AIM2 [10, 32, 38]. Если экзогенная дцДНК проникает во внутриклеточное пространство ДК и взаимодействует с тем или иным сенсором, то через включение соответствующего метаболического каскада происходит активация эффекторных киназ (TBK1, IKK), финальное фосфорилирование транскрипционных факторов (NF-κB, IRF, AP-1), которые, интернализуясь в ядре, связывают и активируют IFNβ промотор. В свою очередь секретлируемый IFNβ связывается с рецептором и активирует Jak/STAT-опосредованный путь запуска экспрессии большого числа интерферон-индуцибельных генов [39, 64]. В результате на ДК повышается экспрессия поверхностных молекул МНС I- и II-класса, костимуляторных молекул (CD40, CD80, CD86), хемокиновых рецепторов. Кроме того, ДК сами начинают активно секретировать хемокины и цитокины, необходимые для привлечения эффекторных клеток и индукции их дифференцировки [7, 44, 49, 76, 80, 87, 96, 97].

**Характеристика метаболических путей реагирования иммунокомпетентных клеток в ответ на интернализацию экзогенной дцДНК**

**RLH-путь передачи сигнала (RIG-like геликазы)**

Ранее считалось, что рецептор TLR3 является единственным сенсором дцРНК молекул, индуцирующих цепь сигнальных событий, приводящих к активации важнейших транскрипционных факторов NF-κB и IRF3/IRF7, регулирующих продукцию интерферонов I типа [7, 58]. Тем не менее, было обнаружено, что противовирусный ответ, наблюдаемый в системе *in vivo*, не отличается у TLR3-дефицитных мышей и у мышей дикого типа [21]. Это предполагало, что существует параллельный механизм распознавания молекул дцРНК. Оказалось, что за этот сигнальный путь индукции иммунного ответа отвечают цитоплазматические геликазы RIG-1 (retinoic-acid-inducible protein 1, Ddx58) и MDA5 (melanoma-differentiation-associated gene 5, Ifih1, Helicard) [15, 36], которые носят название RIG-like геликаз (RLH) [58]. Установлено также, что новый трансдуцирующий сигнальный путь способен воспринимать цитозольную АТ-богатую

дцДНК, и для такого распознавания дцДНК необходимо участие РНК-полимеразы III.

Эксперименты на MDA5-дефицитных мышах показали, что MDA5 и RIG-1 геликазы распознают разные типы дцРНК. MDA5 участвует в детекции пикорнавирусов и отвечает на поли(I:C) ПАМПС сигнал. RIG-1 распознает дцРНК, полученную в результате репликации таких вирусов, как парамиксовирусы и вирусы гриппа [36]. Механизм, позволяющий распознавать RIG-1 и MDA5 разные формы внутриклеточной дцРНК, неизвестен.

Показано, что трансфецированная в клетку поли(dA:dT) ДНК (синтетическая АТ-богатая дцДНК) транскрибируется РНК-полимеразой III. Полученная в результате этого РНК, содержащая 5'-трифосфат, активирует RIG-1 геликазу, и далее через IPS-1 путь передает активирующий сигнал на транскрипционные факторы IRF3 и NF-κB [10, 15, 36]. Эксперименты по РНК-интерференции свидетельствуют, что фармакологическое ингибирование РНК-полимеразы III или блокирование ее структурного компонента POL3RF приводят к остановке синтеза дцРНК по поли(dA:dT) ДНК. Это, в свою очередь, ингибирует RIG-1 опосредованную индукцию интерферонов I типа [15].

Белки RIG-1 и MDA5 содержат два N-концевых CARD домена (домен, стимулирующий взаимодействие с каспазами) и DExD/H-геликазный домен [36, 58]. В процесс передачи сигнала вовлекается адаптерная молекула IPS-1 (MAVS, VISA, Cardif), которая также содержит CARD-домен, за счет которого осуществляется взаимодействие с CARD-доменом молекул RIG-1 и MDA5. С-конец адаптерной молекулы представляет собой трансмембранный регион, связывающийся с внешней мембраной митохондрий [58]. IPS-1, активированный взаимодействием с RIG-1-геликазой, передает сигнал на TBK1- и IKK-киназы, которые фосфорилируют IRF3/IRF7, являющиеся транскрипционными факторами генов интерферонов I типа, что приводит к запуску продукции интерферонов [58, 96, 97]. Отсоединившаяся от митохондрии молекула IPS-1 не способна опосредовать активацию транскрипционных факторов NF-κB и IRF3/IRF7.

Характерно, что TLR3-рецептор также активирует киназы TBK1 и IKK-ι, однако трансдукция сигнала происходит посредством TIR домена адаптерной молекулы TRIF (Ticam1) [88].

Описан также третий член семейства RIG-like геликаз, фактор LGP2. Он не несет CARD-домена и не способен сам по себе индуцировать сигнал, запускающий противовирусный иммунный ответ [58]. Имеются факты, свидетельствующие о том, что геликаза LGP2 способствует распознаванию

вирусной РНК белками RIG-1 и MDA5 через свой АТФ-азный домен [68].

**DAI (DNA associated inductor)-опосредованная индукция интерферонов I типа**

Одним из недавно описанных кандидатов в цитозольные сенсоры дцДНК является DAI (ДНК-зависимый активатор интерферон-регулирующих факторов), называемый также DLM-1/ZBP1, взаимодействие которого с ДНК приводит к индукции интерферонов I типа, интерферон-индуцибельного хемокина Sxс10 и провоспалительных цитокинов, таких как IL-6 и TNF $\alpha$  [49, 76, 87].

DAI как в форме белка, так и в форме матричной РНК присутствует в цитозоле макрофагов, лимфоцитов, стромальных клеток опухоли и клеток множества других тканей [76, 84]. Экспрессию DAI мРНК запускают различные ПАМП, к которым относится В-форма ДНК, интерферон-стимулирующая ДНК (ISD), LPS. DAI мРНК экспрессируется также при стимуляции IFN $\gamma$  и интерферонов I типа (IFN $\alpha/\beta$ ).

Связывание DAI с молекулами ДНК и активация трансдуцирующего пути осуществляется независимо от нуклеотидной последовательности, однако индукция синтеза интерферонов зависит от размера ДНК. Наименее эффективной является ДНК длиной менее 100 п.о., что, как предполагается, обусловлено конформационными особенностями формирования комплекса DAI-ДНК [76, 84, 85].

Молекула DAI состоит из нескольких функциональных блоков. В N-концевом районе она содержит два домена: Z $\alpha$  и Z $\beta$ . Оба домена консервативны для всех идентифицированных последовательностей DAI [84, 85, 87]. Центральный D3 домен молекулы DAI непосредственно связывается с ДНК (в частности с ее Z-формой), что приводит к конформационным изменениям молекулы белка и делает доступными домены Z $\alpha$ /Z $\beta$  для ассоциации с транскрипционным фактором IRF-3 [85]. С-концевой домен DAI несет множество сайтов фосфорилирования и взаимодействует с TBK1 [84, 87]. В работах Wang et al. была проанализирована возможность активации промотора IFN $\beta$  при трансфекции линии клеток PK-15 плазмидами, содержащими ген DAI, мутантный по каждому из трех районов DAI: Z $\alpha$ , Z $\beta$  или С-концу. Оказалось, что нормальный запуск продукции IFN $\beta$  наблюдается только в случае трансфекции плазмидой, содержащей полноразмерный ген DAI [85].

Исследования паттернов экспрессии DAI в тканях мыши и человека показали, что экспрессия DAI является тканеспецифичной, причем тканеспецифичность различна у мыши и человека [87]. У человека DAI в основном экспресси-

руется в клетках тонкой кишки и лимфоидных тканях, таких как лимфатические узлы, в спленопитах, лейкоцитах периферической крови, клетках миндалин и костного мозга. Реже экспрессия DAI наблюдается в клетках тимуса, легких, печени и поджелудочной железы. Для мыши экспрессия DAI характерна для клеток легких, печени и селезенки.

При трансфекции дцДНК в клетку, DAI колокализуется совместно с доставленной ДНК в так называемых стресс-гранулах в цитоплазме [76]. Стресс-гранулы располагаются вблизи ЭПР, однако, их объединения с какими-либо описанными клеточными органеллами не показано [76]. К настоящему времени неизвестно, существуют ли специфические внутриклеточные компартменты, в которых происходит распознавание цитозольной ДНК. Предполагается, что структурно это могут быть аутофагосомы или агресомы, поскольку в некоторых случаях показано, что процесс запуска противовирусного иммунного ответа ассоциирован с аутофагией.

Запуск продукции интерферонов I типа в ответ на DAI-опосредованную индукцию цитозольной ДНК осуществляется двумя путями. В первом случае происходит TBK1-опосредованное фосфорилирование DAI с последующей активацией транскрипционного интерферон-регулирующего фактора IRF3. Во втором случае фосфорилируется киназа, взаимодействующая с белком 1, что приводит к фосфорилированию I $\kappa$ B- $\alpha$  и последующему фосфорилированию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [49, 76, 84, 87]. В дополнение к этому известно, что искусственная димеризация DAI в отсутствие любой формы ДНК также индуцирует экспрессию генов интерферонов, однако уровень такой индукции значительно ниже по сравнению с индукцией молекулами ДНК [85].

Экспериментально показано, что участие транскрипционных факторов IRF3 и IRF7 при DAI-опосредованной индукции клеточного иммунного ответа различно. IRF3 является ключевым фактором в запуске продукции IFN $\beta$  в ответ на цитозольную ДНК, тогда как IRF7 лишь частично кооперирует с IRF3 в этом процессе [76].

Ассоциация DAI с цитозольной ДНК осуществляется через D3 домен DAI, после чего формируется комплекс ДНК с Z $\alpha$ -/Z $\beta$ -доменами. Формирование этого комплекса приводит к димеризации DAI и привлекает в сайт локализации комплекса киназы TBK1 и IRF3. Фосфорилирование DAI киназой TBK1 привлекает дополнительные молекулы TBK1 и IRF3, и формируется петля активации [85]. Предполагается, что в этом процессе также участвует адаптерная молекула IPS-1 [76].

Установлено, что при доставке в цитозоль поли(dA:dT) ДНК может происходить активация NF-κB транскрипционного фактора, независимо от TBK1- и IKK-киназ. В то же время активации NF-κB при стимуляции другими типами синтетической ДНК, например ISD, не наблюдается [35]. Как следует из результатов проведенных экспериментов, ответ на стимуляцию АТ-богатой ДНК происходит не раньше, чем через 120 мин после ее проникновения в клетку. Это наблюдение предполагает, что активация АТ-богатой ДНК в проведенных исследованиях скорее всего вызвана вторичным ответом на цитокины, синтез которых был индуцирован вследствие активности факторов другого пути проведения сигнала, например RLH, при котором активируется NF-κB [76]. Вместе с тем, подавление экспрессии DAI с использованием РНК-интерференции в значительной степени снижает ДНК-опосредованную активацию NF-κB, а также продукцию мишеней этого фактора — IL-6 и активацию IκB-α. Это свидетельствует о том, что DAI напрямую активирует не только IRF3/IRF7, но и NF-κB. Предполагается, что проведение и передача сигнала при активации одного и того же DAI-фактора происходит на два типа транскрипционных факторов, NF-κB и IRF3, и что это во многом зависит от типа дцДНК, интернализованной в цитозоле [49, 76]. DAI-опосредованная активация NF-κB осуществляется IKK-комплексом. В формировании комплекса принимают участие адаптерные молекулы RIP1 и RIP3, взаимодействующие с DAI через RHIM-домен (гомотипический домен, взаимодействующий с RHIM-доменом молекулы RIP) [84].

Известно, что ключевыми транскрипционными факторами, запускающими индукцию интерферонов I типа, являются IRF3 и IRF7. Основываясь на данных о том, что DAI-опосредованная индукция IFNβ может происходить через NF-κB транскрипционный фактор и не зависеть от IRF3, было сделано предположение, что активация NF-κB необходима для начального высвобождения интерферонов I типа, в первую очередь IFNβ. Высвободившийся цитокин по аутокринному механизму активирует другой набор транскрипционных факторов, и это, в свою очередь, запускает сильный иммунный ответ [49]. И таким образом, цитозольный сенсор ДНК DAI необходим для распознавания цитозольной ДНК и запуска TBK1/IRF3- или NF-κB-опосредованного иммунного ответа, связанного с продукцией IFNβ и провоспалительных цитокинов.

#### **Роль IFI16 в запуске иммунного ответа**

Как было сказано в предыдущих разделах, индукция синтеза цитокинов может осуществляться двумя способами: активацией генов цитокинов и продукцией функциональных белков или активацией находящихся в цитозоле предшественников зрелых цитокинов, осуществляющейся в сформированных инфламмосах.

Сигнальные пути, опосредующие формирование инфламмосом, связаны с такими сенсорами, как члены семейства NLR-факторов, и некоторыми членами семейства белков, характеризующимися наличием специфического домена HIN-200 (PYHIN). Как оказалось, одни белки этого семейства являются адаптерными молекулами для проведения сигнала в направлении формирования инфламмосом, тогда как другие работают в направлении экспрессии генов цитокинов. Недавно был идентифицирован белок из семейства HIN-200 (PYHIN), IFI16, участвующий в распознавании цитозольной ДНК, который опосредует индукцию IFNβ [82]. Также было обнаружено, что дополнительно белком IFI16 в распознавание внутриклеточной дцДНК вовлекается молекула STING [33]. Одновременно с этим IFI16 может самостоятельно взаимодействовать с IFNβ-стимулирующими мотивами вирусной ДНК, что вызывает олигомеризацию IFI16 и дальнейшую передачу сигнала, приводящую к запуску синтеза IFNβ [82].

ДК играют ключевую роль в инициации и регуляции иммунного ответа в организме. Цитозольная дцДНК является индуктором активации и созревания ДК человека [39]. Установлено, что в этом типе клеток основным сенсором молекул ДНК является IFI16. Как следует из результатов экспериментов по РНК-интерференции, такие сенсоры, как AIM2 [28, 65], DAI [77], РНК-полимераза III [4, 15] или HMGB [39], не активируют ДК. По сравнению с ДК, индуцированными LPS или смесью провоспалительных цитокинов, ДНК-активированные ДК индуцируют CD4<sup>+</sup>T-клетки к продукции большего количества IL-2, IFNγ и гранзимов. Такие CD4<sup>+</sup>T-клетки более эффективно лизируют клетки опухоли *in vitro*. Также ДК, активированные дцДНК, индуцируют В-клетки к продукции комплемент-связывающих IgG1 и IgG3 антител.

Интересен тот факт, что IRF3/IRF7-дефицитные ДК могут быть полностью активированы цитозольной ДНК, тогда как NF-κB совершенно необходим для приобретения ДНК-активированными ДК полного спектра функций, таких как экспрессия CD86, провоспалительных цитокинов, миграция ДК и активация Т-клеток [39]. Это предполагает, что передача сигнала происходит по цепи, в которой в обязательном порядке присутствуют IFI16 и NF-κB. Также в трансдукцию сигнала с участием IFI16 вовлечена адаптерная молекула IPS-1.

Таким образом, IFI16 участвует в активации ДК человека дцДНК и последующей индукции адаптивного иммунного ответа, однако он не является единственным необходимым цитозольным сенсором цитозольной ДНК [39].



### ***STING и его участие в индукции врожденного иммунного ответа***

Активация ПРП приводит к развитию иммунного ответа, результатом чего является индукция продукции интерферонов I типа, главным образом IFN $\beta$  [76]. Недавно был обнаружен фактор STING (stimulator of interferon genes), или MITA/MPYS/ERIS/TMEM13, который локализуется в эндоплазматическом ретикулуме макрофагов, ДК, а также эндотелиальных и эпителиальных клеток. STING индуцирует активацию NF- $\kappa$ B и IRF3 путей запуска продукции интерферонов I типа в ответ на различные типы дцДНК и РНК молекул, интернализованных во внутриклеточных компартментах [10, 33, 66, 67].

Установлено, что STING-дефицитные мыши не способны индуцировать продукцию интерферонов I типа в ответ на инфицирование HSV-1 вирусом и при трансфецировании ISD-ДНК [10, 33, 66, 67]. Как следует из проведенных экспериментов, в мышинных фибробластах, дефицитных по STING, обе эффекторные киназы TBK1 и IKK не получают активирующего сигнала. При этом не происходит транслокации факторов IRF3/IRF7 в ядро и синтез интерферонов блокируется [33].

STING незначительно влияет на способность мышей к продукции интерферонов I типа при стимуляции дцРНК (олиго(I:C)) или инфицировании вирусами с положительной цепью РНК (например, вирус энцефаломиелокардита). Ответ на стимуляцию таким типом нуклеиновых кислот, как было описано ранее, происходит RLH-опосредованным путем. Незначительное участие фактора STING в ответе на олиго(I:C) дцРНК и РНК-вирусы с положительной цепью объясняется тем, что STING может служить дополнительным (альтернативным) трансдуктором сигнала RIG-1/IPS-1-опосредованного пути. Вовлечение фактора STING в RLH-трансдуцирующий путь, как предполагается, может осуществляться следующим образом. Присутствие в клетке РНК, содержащей 5'-фосфат, или АТ-богатой ДНК, посредством РНК-полимеразы III, активирует RIG-1. Далее сигнал передается на адаптерную молекулу IPS-1, ассоциированную с митохондриями, которые, в свою очередь, тесно связаны с эндоплазматическим ретикуломом. STING также ассоциирован с эндоплазматическим ретикуломом через так называемые структуры МАМ и может взаимодействовать с IPS-1, что и приводит к активации STING-опосредованного пути [31].

Таким образом, дцДНК и РНК различного контекстного состава могут индуцировать STING-опосредованный путь активации эффекторных киназ. АТ-богатая ДНК может инду-

цировать как STING-зависимый, так и STING-независимый путь запуска врожденного иммунного ответа, что было показано на STING-дефицитных мышах [10]. STING-независимый путь активации иммунного ответа клетки осуществляется через РНК-полимераза III/RIG-1/IPS-1 сигнальный путь [33].

Анализ аминокислотной последовательности молекулы STING свидетельствует о том, что фактор не содержит предсказанных ДНК-связывающих доменов и, по-видимому, непосредственно не взаимодействует с молекулой ДНК. В этой связи предполагается, что существует другой сенсор ДНК, отвечающий за активацию STING [10]. Для ДК, например, показано, что непосредственным сенсором молекул дцДНК при индукции STING-опосредованного пути является описанный ранее белок IFI16 [39].

После появления в клетке молекул дцДНК и передачи сигнала с ДНК-сенсора, STING, ассоциированный с МАМ эндоплазматического ретикулума, начинает быстро перемещаться через аппарат Гольджи в перинуклеарное пространство, где он ассоциирует с TBK1 и IKK-киназами на цитоплазматических пятнистых структурах [33, 66, 67]. Процесс перемещения сопряжен с убиквитинированием STING [33, 98] и требует участия фактора EXOC2/Sec5, который способствует процессу везикулярного транспорта [14, 33, 66, 67].

Установлено, что в эндосомальных компартментах комплекс STING/TBK1 ассоциирует с аутофагальным белком Atg9a и легкой цепью белка 1 LC3. Atg9a контролирует корректную ассоциацию STING и TBK1. В отсутствие Atg9a происходит усиление ассоциации STING и TBK1, что приводит к aberrантной активации иммунного ответа [66, 67]. Комплекс STING/TBK1 индуцирует IRF3-зависимую транскрипцию интерферонов I типа. Ассоциация STING с другой MAP-киназой, IKK, индуцирует активацию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, который, в свою очередь, приводит к запуску продукции провоспалительных цитокинов [10].

Таким образом, STING представляет собой цитоплазматический фактор, в первую очередь реагирующий на появление в цитозоле молекул дцДНК и опосредованно участвующий в ответе на молекулы РНК. Активация STING приводит к TBK1-опосредованной индукции факторов IRF3/IRF7 и синтезу интерферонов I типа. Одновременно STING индуцирует NF- $\kappa$ B фосфорилирование и запускает экспрессию генов провоспалительных цитокинов. В результате указанных событий индуцируется развитие иммунного ответа в различных типах клеток, как иммунных, так и не иммунных [33].

Недавно было обнаружено, что ДНКазы III (3'-5' ДНК экзонуклеаза), известная как TREX1, является регулятором гомеостаза ДНК в клетках, сопряженных с аутоиммунными и воспалительными заболеваниями [16, 17, 46, 56, 73]. Показано, что TREX1 локализуется в эндоплазматическом ретикулуме и перемещается в ядро при повреждении хромосомной ДНК. При этом молекула TREX1 сама по себе не является ДНК-сенсором. В отсутствие TREX1 молекулы оцДНК длиной 60-65 п.о., возникающие, по-видимому, в результате нарушений в репликации ДНК, накапливаются в ЭР цитоплазмы в S-фазе и могут являться индуктором развития иммунного ответа. Аккумуляция оцДНК в клетках TREX1-дефицитных мышей ассоциирована с дефектами в G1/S переходах и хронической АТМ-зависимой активации чек-пойнтов, что характерно при повреждении хромосомной ДНК [91].

Установлено, что TREX1 локализуется совместно со STING в эндоплазматическом ретикулуме. Поскольку STING является одним из факторов, индуцирующих развитие иммунного ответа при появлении в цитоплазме ДНК или РНК молекул, предполагается, что активность TREX1 контролирует указанную функцию STING через регуляцию количества цитозольных нуклеиновых кислот [84]. Возможно, что регуляция количества цитозольной ДНК 3'-5' ДНК экзонуклеазой TREX1 является фактором, контролирующим активацию многих типов сенсорных и трансдуцирующих путей, использующих внутриклеточную ДНК и РНК в качестве активирующего субстрата. Приведенные результаты подчеркивают важность поддержания гомеостаза ДНК в клетке, необходимого для предотвращения самоактивации иммунного ответа, который может привести к аутоиммунным заболеваниям и системным воспалительным реакциям.

#### ***NOD-like рецепторы***

При изучении запуска сигнальных механизмов активации врожденного иммунитета в ответ на проникновение чужеродных организмов, были описаны два семейства цитозольных ПРР: NOD-like рецепторы (NLRs) и вышеописанные RIG-like геликазы (RLHs) [58]. В отличие от хорошо известных TLRs, члены этих семейств представляют собой растворимые белки, которые «осматривают» цитоплазму на предмет присутствия внутриклеточных «интервентов» или других сигналов опасности. Сигнализация от этих ПРР запускает развитие клеточных иммунных реакций.

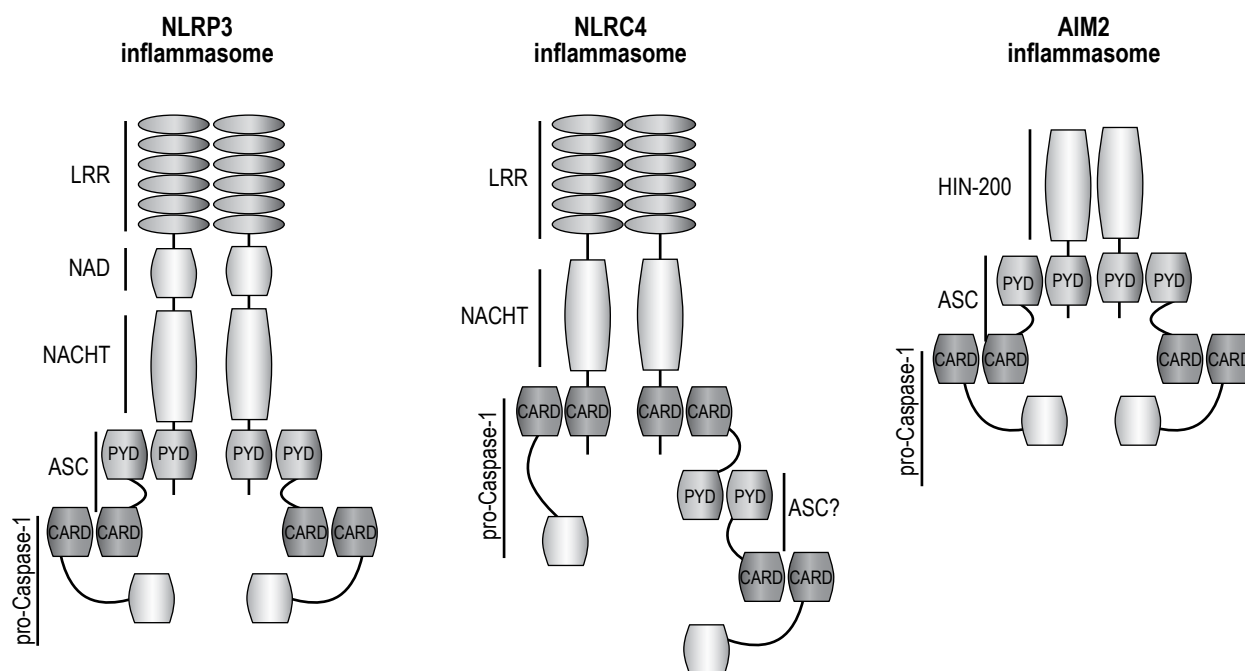
NLR-рецепторы представляют собой семейство ПРР, которые имеют три структурных домена: варибельный лиганд-распознающий лейцин-богатый повтор (LRR); NACHT до-

мен, ответственный за олигомеризацию и связывание нуклеотидов; и эффекторный домен, который может быть представлен пириновым доменом (PYD), CARD доменом (домен, привлекающий каспазы), или BIR доменом (бакуловирусный IAP повтор) [54, 58, 84]. Большинство NLR-рецепторов несет также ассоциированный с NACHT NAD-домен.

Семейство NLRs включает два больших подсемейства: подсемейство PYD-содержащих NALP-рецепторов (NALP1-NALP14) и подсемейство CARD-содержащих NOD-like рецепторов (NOD1-NOD4, NOD5 CARD-домена не несет). Также к семейству NLRs относятся CARD-содержащие белки CIITA, IPAF (ICE-protease activating protein) [63] и BIR-содержащий белок NAIP [54, 58].

Представители NLR-рецепторов распознают различные патоген-ассоциированные молекулярные паттерны. Так, NOD1 и NOD2 детектируют пептидогликаны Грамм-положительных и Грамм-отрицательных бактерий, связывание с которыми вызывает их олигомеризацию и привлечение серин/треониновой киназы RIP2 к CARD-домену, что приводит к активации митоген-активируемых протеин-киназ и NF-κB [25, 29, 83]. Другая группа представителей семейства NLR-рецепторов – NALP, как показано, играет важную роль в активации провоспалительных каспаз через формирование протеолитических комплексов – инфламасом [25, 58] (рис. 2). NALP1 формирует инфламасому совместно с адаптерной молекулой ASC, каспазами-1 и -5 [52]. NALP2 или NALP3 при формировании инфламасомы ассоциируют с CARD-содержащим белком Cardin, ASC и каспазой-1, без участия каспазы-5 [5]. Оба описанных типа инфламасом контролируют процессинг и активацию провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-18.

Наиболее хорошо изученным комплексом NLR-инфламасома, участвующим в распознавании цитозольной ДНК, является инфламасома, формируемая с участием NALP3 (называемая также криопирин), адаптерной молекулы ASC и каспазы-1 [84]. После активации ДНК белок NALP3 олигомеризуется и через свой PYD-домен взаимодействует с привлеченной молекулой ASC (PYD-CARD), затем этот комплекс через CARD-домен адаптерной молекулы привлекает каспазу-1. Активированная каспаза-1 запускает процессинг большого числа различных клеточных субстратов, в том числе цитокинов IL-1β и IL-18. IL-1β является основным провоспалительным медиатором, привлекающим дендритные клетки и макрофаги в места повреждения или воспаления [10]. Каспаза-1 не является проапоптотической каспазой, но вовлекается



**Рисунок 2. Структура NLRP3, NLR4 и AIM2 инфламмасом [22]**

**Примечание.** LRR – лейцин-богатые повторы, распознающие дцДНК; NAD и NACHT – домены олигомеризации; ASC – адаптерная молекула; HIN-200 – специфический домен связывания дцДНК.

в гликолиз и воспалительную форму клеточной смерти, называемую пироптоз [23, 69]. Пироптоз был недавно описан в макрофагах и является запрограммированной клеточной смертью, связанной с потерей проницаемости клеточной мембраны, и ассоциирован с секрецией IL-1 $\beta$  и IL-18.

Показано, что лигандами NALP3 инфламмосомы могут быть не только ПАМП, но и ДАМП (ассоциированные с опасностью молекулярные паттерны), такие как утечка внутриклеточного калия при воздействии бактериальных токсинов [52, 58], АТР, NAD<sup>+</sup> [58, 84], или некротические клеточные лизаты, как эндогенные факторы активации врожденного иммунитета [58]. Сигналами опасности могут быть эндогенные кристаллы однозамещенного урата натрия, образующиеся в стрессовых условиях, которые вызывают прямую активацию дендритных клеток и других клеток иммунной системы, например, макрофагов, без примирования их чужеродным материалом [55, 71]. Кристаллы двуводного пирофосфата кальция, обнаруженные при артропатии псевдоподагры, также активируют NALP3 инфламмосомы [53], что предполагает участие NALP3 в роли одного из важнейших рецепторов сигналов опасности в клетке [58].

Предполагаемая активация NLR происходит по следующему пути. Рецепторы NLR синте-

зируются в ауторепрессированной неактивной форме. Полагают, что их лейцин-богатые повторы конформационно отдалены от остальных частей белка, при этом блокируется NACHT-опосредованная олигомеризация рецепторов. Связывание лейцин-богатых повторов (LRR) с лигандом вызывает специфическую активацию сенсорной молекулы (рецептора), индуцируя NACHT-опосредованную олигомеризацию, формирование комплексов с адаптерными молекулами (ASC, Cardinal) и активацию эффекторных молекул (каспаза-1/5, RIP2) [54, 58]. Результатом этих взаимодействий является процессинг предшественников важных провоспалительных цитокинов, среди которых IL-1 $\beta$  и IL-18.

Недавно на макрофагах было показано, что трансфекция ДНК в цитоплазму запускает NALP3-независимую, но ASC-опосредованную активацию каспазы-1 и созревание IL-1 $\beta$ , что предполагало существование новой ДНК-воспринимающей системы, связанной с формированием инфламмасом [84]. Активация таких инфламмасом была лимитирована размером дцДНК, но не зависела от последовательности, также не имело значения происхождение ДНК – вирусная, бактериальная, ДНК млекопитающих и синтетическая ДНК одинаковым образом активировали каспазу-1. Оказалось, что новым сенсором ДНК является фактор AIM2.

### **AIM2 и инфламмасомы**

AIM2 (absent in melanoma 2) является сенсором цитозольной ДНК, относящимся к семейству интерферон-индуцибельных NIN-200 рецепторов [10, 24, 65, 84]. AIM2 экспрессируется в цитозоле и содержит NIN-200 домен, который непосредственно связывается с дцДНК, приводя к олигомеризации сенсорной молекулы и привлечению ASC адаптера. Также AIM2 содержит PYD-домен, который взаимодействует с PYD-доменом ASC адаптера. Дальнейшее привлечение и активация каспазы-1 приводит к формированию инфламмасомы, в которой происходит созревание предшественника IL-1 $\beta$  и запускается пироптоз. Этот факт интересен в том отношении, что образование инфламмасомы происходит при участии белка, не относящегося к NLR-семейству. Также впервые было показано прямое взаимодействие между рецептором инфламмасомы и его лигандом.

К семейству NIN-200 рецепторов помимо AIM2 относятся также белки IFIX, IFI16, MNDA [10, 65]. Общность механизмов действия белков этого семейства явилась основанием объединения их в группу так называемых AIM2-like рецепторов. В отличие от других цитозольных сенсоров ДНК, таких как STING, которые запускают интерфероновый ответ I типа, AIM2-зависимая сигнализация приводит к активации каспазы-1 и продукции провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-18 [10]. Участие члена семейства NIN-200 белка IFI16 в распознавании цитозольной ДНК было описано в предыдущих разделах.

Распознавание ДНК и формирование инфламмасом не является основным свойством всех белков семейства NIN-200 человека. Так, P202, мышинный белок семейства NIN-200, является негативным регулятором формирования AIM2 инфламмасом. Этот белок содержит два NIN-200 домена, за счет которых он связывает дцДНК, специфично ее длине, но не последовательности, конкурируя с AIM2 за его субстрат [65].

### **Предполагаемая роль HMGB в активации врожденного иммунитета**

В исследованиях последних лет появились сведения о существовании еще одной группы универсальных белков, распознающих внутриклеточные нуклеиновые кислоты и запускающих сигнальные пути активации врожденного иммунитета. Этими белками являются так называемые белки группы высокой мобильности (HMGB) [89].

Первоначально на мышинных эмбриональных фибробластах и ДК, выделенных из HMGB1-дефицитных мышей, было установлено, что в ответ на трансфецированную в цитоплазму В-ДНК или поли(I:C) продукции интерферонов I типа,

IL-6 и CCL5 не происходит. Далее было установлено, что индукция генов цитокинов в фибробластах мышей, дефицитных по HMGB2, наблюдалась при стимуляции В-ДНК, но не поли(I:C), что свидетельствовало о взаимодействии HMGB2 только с дцДНК. Подавление экспрессии всех трех генов (*hmgb1-3*) методом РНК-интерференции снижало продукцию интерферонов I типа и цитокинов в ответ на стимуляцию и В-ДНК, и поли(I:C) в большей степени, чем это было показано в экспериментах с мышами, дефицитными по HMGB1 и HMGB2. Этот факт свидетельствует об участии HMGB3 в распознавании как В-ДНК, так и поли(I:C). Схожие результаты были получены при стимуляции клеток интерферон-стимуляторной ДНК (ISD), вирусной или бактериальной ДНК, оцРНК, несущей 5'-фосфат. Одновременно с этим продукция цитокинов в ответ на LPS в мышинных эмбриональных фибробластах с подавленной экспрессией HMGB1-3 обнаруживалась на высоком уровне. Такое наблюдение предполагает, что дефицит белков HMGB1-3 не влияет на транскрипцию генов цитокинов, а скорее блокирует передачу сигнала после обнаружения цитозольной ДНК. С этим согласуются данные о том, что в случае активации LPS передача сигнала происходит с участием RIG-1/MDA5, TLRs, AIM2 и STING [89].

В дополнение к вышесказанному была подтверждена роль HMGB белков в активации TLRs. Экспериментально показано, что взаимодействие TLRs с нуклеиновыми кислотами-агонистами неэффективно в плазмацитойдных ДК при отсутствии в них белков HMGB [81, 89]. Предполагается, что связывание нуклеиновых кислот с HMGB является предпосылкой для более эффективного последующего распознавания и активации TLR, RLH и цитозольных рецепторов нуклеиновых кислот [89].

### **Возможные причины существования двух независимых сенсорных систем при распознавании молекул экзогенной экстраклеточной ДНК**

Анализ последовательности событий в цепи взаимодействий «ПАМП (дцДНК) → PPP (TLR, цитозольный сенсор) → сигнальный путь → иммунный ответ» обнаруживает следующие закономерности.

Распознавание экзогенной/экстраклеточной дцДНК может осуществляться по двум автономным сенсорным программам, одна из которых характерна для специализированных клеток иммунной системы, другая присуща, по-видимому, всем клеткам организма. В соответствии с этим, выделяют две больших группы PPP. Одну из них составляет хорошо изученное семейство Toll-like рецепторов, характерное для специализирован-

ных клеток иммунной системы [12, 40, 41, 57]. Ко второй группе можно отнести недавно охарактеризованные цитозольные сенсорные факторы, описанные в настоящем обзоре, — DAI, IFI16, STING, семейства RLH, HIN-200, NLR, которые экспрессируются в различных типах соматических клеток [8-10, 34, 43, 70, 78, 86]. Оба типа детектирующих систем могут индуцировать продукцию интерферонов I типа и провоспалительных цитокинов, однако пути такой активации и мода генерируемого иммунного ответа различаются.

Одной из основных особенностей, различающих две группы распознающих сигнальных систем, является их особая специфичность в отношении детекции ДНК, связанная с типом интернализации ДНК в клетку.

В случае специализированных клеток (ДК, макрофагов, нейтрофилов) первоначально происходит обнаружение соответствующих ПАМП (клеточная стенка, вирусная частица и т.п.) и осуществляется фагоцитоз фрагмента патогена или целого микроорганизма. Вследствие прошедшего фагоцитоза, фрагменты патогена оказываются в эндо-фагосомах одновременно с ассоциированными с ними молекулами ДНК (РНК), которые в качестве лигандов распознаются внутренними ПРР, такими как TLR7 и TLR9. В результате происходит активация профессиональных свойств антигенпрезентирующих клеток, и процессированные антигены в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС I или II класса) презентуются на поверхности клетки. Для фагоцитоза не связанных с клеточными компонентами фрагментами дцДНК необходимо формирование комплекса ДНК, например, с антителами против ДНК [13, 93].

Напротив, для активации цитозольных сенсоров необходимо проникновение активирующего начала непосредственно в клетку. Это либо прямое инфицирование клетки (ДНК, РНК вирусов), либо интернализация экзогенной дцДНК, например, через рецептор-опосредованный пиноцитоз [3]. Любая клетка может быть инфицирована вирусом, как и любая клетка может оказаться в окружении большого количества фрагментов экстраклеточной дцДНК, появившейся в результате какого-либо повреждения тканей организма, которое сопровождается гибелью (апоптозом/некрозом) части клеток и неорганизованной интернализацией высвободившейся ДНК в «выживших» клетках микроокружения. В этом смысле цитозольная система детекции, в силу своего диффузного распределения по цитоплазме клетки, имеет большую эффективность в обнаружении фрагментов ДНК или РНК, проник-

ших в клеточное пространство [34, 60, 90]. При инфекции вирусами через систему цитозольных сенсоров индуцируется запуск продукции интерферонов I типа/провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$  и IL-18) в различных соматических клетках, хотя специализированные иммунные клетки также отвечают аналогичной иммунной реакцией на проникновение молекул ДНК (РНК) [34, 60, 62, 78, 93]. Однотипность реагирования соматических и иммунных клеток на вирусную инвазию синхронизирует процессы активации интерферон-индуцибельных генов и обеспечивает более эффективное развитие противовирусного иммунного ответа. Интерфероны I типа, секретирующиеся в результате активации цитозольных сенсоров дцДНК (РНК), индуцируют синтез IL-15, который усиливает пролиферацию натуральных киллерных клеток и CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов, а также индуцирует дифференцировку CD8<sup>+</sup>T-клеток в цитотоксические лимфоциты. Под влиянием интерферонов I типа усиливается экспрессия мРНК перфоринов/гранзимов в натуральных киллерных клетках и CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитах. IL-1 $\beta$  является ключевым цитокином среди провоспалительных медиаторов «первой волны», обеспечивающих направленный трафик ДК, макрофагов, Т- и В-лимфоцитов в места повреждения, воспаления или области проникновения вирусной инфекции [10]. IL-18 индуцирует синтез IFN $\gamma$  и стимулирует активность натуральных киллерных клеток. Таким образом, формируется полноценный иммунный ответ на проникновение вирусных нуклеиновых кислот.

С другой стороны, индукция секреции интерферонов I типа/провоспалительных цитокинов в соматических клетках также характерна при интернализации фрагментов экстраклеточной дцДНК не вирусного происхождения [8, 62] и также зависит от активности цитозольных сенсоров.

Очевидно, что обе системы детекции нуклеиновых кислот выполняют защитную функцию организма. Система TLRs специализированных иммунных клеток (ДК, макрофагов, нейтрофилов), в первую очередь, ориентирована на распознавание патогенных нуклеиновых кислот (ДНК/РНК) в составе бактериальных/вирусных ПАМП. При массивном повреждении тканей организма (некроз, травма, ишемия, и т.д.), которое приводит к высвобождению/накоплению на локальном и/или системном уровне большого количества продуктов клеточного распада (в том числе дцДНК), в процессы распознавания и реагирования на эндогенные, экстраклеточные нуклеиновые кислоты, помимо специализированных иммунных клеток, могут включаться и другие соматические, тканеспецифические клетки, ко-

торые также оснащены своими цитозольными сенсорами (DAI, IFI16, STING, семейства RLH, NIN-200, NLR). В результате происходит более эффективная мобилизация и активация различных молекулярных и клеточных систем, направленных, в первую очередь, на связывание/нейтрализацию свободных фрагментов нуклеиновых кислот.

Акцидентальное появление в организме большого количества свободной, эндогенной дцДНК опасно по нескольким причинам. Во-первых, это может спровоцировать запуск и развитие аутоиммунного процесса, который проявляется увеличением сывороточного уровня анти-ДНК-аутоантител и циркулирующих иммунных комплексов, что очень часто сопровождает развитие такой тяжелой аутоиммунной патологии, как системная красная волчанка, системная склеродермия, аутоиммунный гломерулонефрит и т.д. Во-вторых, нахождение свободных, несвязанных фрагментов дцДНК в системном кровотоке в течение длительного периода времени может приводить к увеличению ее уровня в органах и тканях, расположенных дистантно от первичного очага повреждения, например, в костномозговых нишах, где дцДНК может интернализироваться в стволовые клетки. Установлено, что интерна-

лизированные фрагменты ДНК участвуют в репаративно-рекомбинационных процессах, идущих в стволовые клетки [20, 47, 48]. Предполагается, что если в ходе нормальной репликации стволовых клеток образуются временные aberrantные двуцепочечные концы [50, 61], то фрагменты экстраклеточной ДНК, находящиеся в ядерном пространстве, могут интерферировать корректное восстановление целостности хромосомы, что приведет к катастрофическим для стволовых клеток последствиям, например, нарушению их дифференцировочного потенциала или снижению способности к самоподдержанию. Таким образом, избыток экстраклеточной дцДНК представляет большую потенциальную опасность для организма, поскольку опосредованно через повреждающее действие на стволовые клетки может приводить к системным нарушениям гемо- и лимфоиммунопоэза. Именно высокой вероятностью развития аутоиммунных реакций и нарушения репаративно-рекомбинационных процессов, идущих в стволовых клетках, можно объяснить наличие в организме системы цитозольных сенсоров, направленных на «аварийное» включение механизмов связывания/нейтрализации избыточного количества фрагментов эндогенной экстраклеточной дцДНК.

## Список литературы

1. Олишевский С.В., Козак В.В., Яниш Ю.В., Рыбалко С.Л., Шляховенко В.А. Иммуностимулирующая CpG-ДНК: перспективы клинического применения в онкологии // Онкология. — 2006. — Т. 8. — С. 209-217.
2. Ракофф-Наум С., Меджитов Р. Роль Toll-подобных рецепторов в репарации тканей и канцерогенезе // Биохимия. — 2008. — Т. 73. — С. 690-698.
3. Челобанов Б.П., Лактионов П.П., Власов В.В. Белки, участвующие в связывании и поглощении клетками нуклеиновых кислот // Биохимия. — 2006. — Т. 71, № 6. — С. 725-741.

Ссылки 4-98 см. в References (стр. 426-430). See References for numbers 4-98 at pp. 426-430.

## References

1. Olisheskiy S.V., Kozak V.V., Yanish Yu.V., Rybalko S.L., Shlyakhovenko V.A. Immunostimuliruyushchaya CpG-DNK: perspektivy klinicheskogo primeneniya v onkologii [Immunostimulatory CpG DNA: prospects for clinical use in oncology]. *Onkologiya — Oncology*, 2006, vol. 8, pp. 209-217.
2. Rakoff-Naum S., Medzhitov R. Rol' Toll-podobnykh retseptorov v reparatsii tkaney i kantserogeneze [Role of Toll-like receptors in tissue repair and carcinogenesis]. *Biokhimiya — Biochemistry*, 2008, vol. 73, pp. 690-698.
3. Chelobanov B.P., Laktionov P.P., Vlasov V.V. Belki, uchastvuyushchie v svyazyvanii i pogloshchenii kletkami nukleinovykh kislot [Proteins involved in binding and uptake of nucleic acids by the cell]. *Biokhimiya — Biochemistry*, 2006, vol. 71, no. 6, pp. 725-741.
4. Ablasser A., Bauernfeind F., Hartmann G., Latz E., Fitzgerald K.A., Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat. Immunol.*, 2009, vol. 10, no. 10, pp. 1065-1072.
5. Agostini L., Martinon F., Burns K., McDermott M.F., Hawkins P.N., Tschopp J. NALP3 forms an IL-1 beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*, 2004, vol. 20, no. 3, pp. 319-325.
6. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, vol. 124, no. 4, pp. 783-801.
7. Alexopoulou L., Holt A.C., Medzhitov R., Flavell R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2001, vol. 413, no. 6857, pp. 732-738.

8. Barbalat R., Ewald S.E., Mouchess M.L., Barton G.M. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, 2011, vol. 29, pp. 185-214.
9. Barber G.N. Cytoplasmic DNA innate immune pathways. *Immunol. Rev.*, 2011, vol. 243, no. 1, pp. 99-108.
10. Barber G.N. Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. *Curr. Opin. Immunol.*, 2011, vol. 23, no. 1, pp. 10-20.
11. Blasius A.L., Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, 2010, vol. 32, no. 3, pp. 305-315.
12. Bode C., Zhao G., Steinhagen F., Kinjo T., Klinman D.M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines*, 2011, vol. 10, no. 4, pp. 499-511.
13. Chen M., Zhang W., Xu W., Zhang F., Xiong S. Blockade of TLR9 signaling in B cells impaired anti-dsDNA antibody production in mice induced by activated syngenic lymphocyte-derived DNA immunization. *Mol. Immunol.*, 2011, vol. 48, no. 12-13, pp. 1532-1539.
14. Chien Y., Kim S., Bumeister R., Loo Y.M., Kwon S.W., Johnson C.L., Balakireva M.G., Romeo Y., Kopelovich L., Gale M.Jr., Yeaman C., Camonis J.H., Zhao Y., White M.A. RalB GTPase-mediated activation of the I $\kappa$ B family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival. *Cell*, 2006, vol. 127, no. 1, pp. 157-170.
15. Chiu Y.H., Macmillan J.B., Chen Z.J. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell*, 2009, vol. 138, no. 3, pp. 576-591.
16. Crow Y.J., Hayward B.E., Parmar R., Robins P., Leitch A., Ali M., Black D.N., van Bokhoven H., Brunner H.G., Hamel B.C., Corry P.C., Cowan F.M., Frints S.G., Klepper J., Livingston J.H., Lynch S.A., Massey R.F., Meritet J.F., Michaud J.L., Ponsot G., Voit T., Lebon P., Bonthron D.T., Jackson A.P., Barnes D.E., Lindahl T. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutieres syndrome at the AGS1 locus. *Nat. Genet.*, 2006, vol. 38, no. 8, pp. 917-920.
17. Crow Y.J., Leitch A., Hayward B.E., Garner A., Parmar R., Griffith E., Ali M., Semple C., Aicardi J., Babul-Hirji R., Baumann C., Baxter P., Bertini E., Chandler K.E., Chitayat D., Cau D., Dery C., Fazzi E., Goizet C., King M.D., Klepper J., Lacombe D., Lanzi G., Lyall H., Martinez-Frias M.L., Mathieu M., McKeown C., Monier A., Oade Y., Quarrell O.W., Rittey C.D., Rogers R.C., Sanchis A., Stephenson J.B., Tacke U., Till M., Tolmie J.L., Tomlin P., Voit T., Weschke B., Woods C.G., Lebon P., Bonthron D.T., Ponting C. P., Jackson A.P. Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutieres syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nat. Genet.*, 2006, vol. 38, no. 8, pp. 910-916.
18. Decker P., Singh-Jasuja H., Haager S., Kötter I., Rammensee H.G. Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation. *J. Immunol.*, 2005, vol. 174, pp. 3326-3334.
19. Diebold S.S., Kaisho T., Hemmi H., Akira S., Reis E., Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 2004, vol. 303, pp. 1529-1531.
20. Dolgova E.V., Proskurina A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Alyamkina E.A., Orishchenko K.E., Rogachev V.A., Efremov Y.R., Dubatolova T.D., Prokopenko A.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Taranov O.S., Omigov V.V., Zagrebelskiy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. "Delayed death" phenomenon: A synergistic action of cyclophosphamide and exogenous DNA. *Gene*, 2012, vol. 495, pp. 134-145.
21. Edelmann K.H., Richardson-Burns S., Alexopoulou L., Tyler K.L., Flavell R.A., Oldstone M.B. Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? *Virology*, 2004, vol. 322, pp. 231-238.
22. Eitel J., Suttorp N., Opitz B. Innate immune recognition and inflammasome activation in listeria monocytogenes infection. *Front. Microbiol.*, 2010, vol. 1, no. 149, pp. 1-7.
23. Fernandes-Alnemri T., Wu J., Yu J.W., Datta P., Miller B., Jankowski W., Rosenberg S., Zhang J., Alnemri E.S. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ.*, 2007, vol. 14, no. 9, pp. 1590-1604.
24. Fernandes-Alnemri T., Yu J.W., Datta P., Wu J., Alnemri E.S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*, 2009, vol. 458, no. 7237, pp. 509-513.
25. Franchi L., Warner N., Viani K., Nunez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol. Rev.*, 2009, vol. 227, no. 1, pp. 106-128.
26. Heil F., Hemmi H., Hochrein H., Ampenberger F., Kirschning C., Akira S., Lipford G., Wagner H., Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 2004, vol. 303, pp. 1526-1529.
27. Honda K., Takaoka A., Taniguchi T. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*, 2006, vol. 25, no. 3, pp. 349-360.
28. Hornung V., Ablasser A., Charrel-Dennis M., Bauernfeind F., Horvath G., Caffrey D.R., Latz E., Fitzgerald K.A. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*, 2009, vol. 458, no. 7237, pp. 514-518.
29. Inohara N., Ogura Y., Fontalba A., Gutierrez O., Pons F., Crespo J., Fukase K., Inamura S., Kusumoto S., Hashimoto M., Foster S.J., Moran A.P., Fernandez-Luna J.L., Nunez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, no. 8, pp. 5509-5512.

30. Ishii K.J., Kawagoe T., Koyama S., Matsui K., Kumar H., Kawai T., Uematsu S., Takeuchi O., Takeshita F., Coban C., Akira S. TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature*, 2008, vol. 451, no. 7179, pp. 725-729.
31. Ishikawa H., Barber G.N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signaling. *Nature*, 2008, vol. 455, no. 7213, pp. 674-678.
32. Ishikawa H., Barber G.N. The STING pathway and regulation of innate immune signaling in response to DNA pathogens. *Cell Mol. Life Sci.*, 2011, vol. 68, no. 7, pp. 1157-1165.
33. Ishikawa H., Ma Z., Barber G.N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*, 2009, vol. 461, no. 7265, pp. 788-792.
34. Iwasaki A., Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 2010, vol. 327, no. 5963, pp. 291-295.
35. Kaiser W.J., Upton J.W., Mocarski E.S. Receptor-interacting protein homotypic interaction motif-dependent control of NF-kappa B activation via the DNA-dependent activator of IFN regulatory factors. *J. Immunol.*, 2008, vol. 181, no. 9, pp. 6427-6434.
36. Kato H., Takeuchi O., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Matsui K., Uematsu S., Jung A., Kawai T., Ishii K.J., Yamaguchi O., Otsu K., Tsujimura T., Koh C.S., Reis e Sousa C., Matsuura Y., Fujita T., Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 2006, vol. 441, no. 7089, pp. 101-105.
37. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, 2010, vol. 11, no. 5, pp. 373-384.
38. Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 2011, vol. 34, no. 5, pp. 637-650.
39. Kis-Toth K., Szanto A., Thai T.H., Tsokos G.C. Cytosolic DNA-activated human dendritic cells are potent activators of the adaptive immune response. *J. Immunol.*, 2011, vol. 187, no. 3, pp. 1222-1234.
40. Krieg A.M. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006, vol. 5, no. 6, pp. 471-484.
41. Krieg A.M. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J. Clin. Invest.*, 2007, vol. 117, pp. 1184-1194.
42. Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., Klinman D.M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 1995, vol. 374, pp. 546-549.
43. Kumagai Y., Akira S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, vol. 125, no. 5, pp. 985-992.
44. Latz E., Schoenemeyer A., Visintin A., Fitzgerald K.A., Monks B.G., Knetter C.F., Lien E., Nilsen N.J., Espevik T., Golenbock D.T. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.*, 2004, vol. 5, pp. 190-198.
45. Lee M.S., Kim Y.J. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu. Rev. Biochem.*, 2007, vol. 76, pp. 447-480.
46. Lee-Kirsch M.A., Gong M., Chowdhury D., Senenko L., Engel K., Lee Y.A., de Silva U., Bailey S.L., Witte T., Vyse T.J., Kere J., Pfeiffer C., Harvey S., Wong A., Koskenmies S., Hummel O., Rohde K., Schmidt R.E., Dominiczak A.F., Gahr M., Hollis T., Perrino F.W., Lieberman J., Hubner N. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.*, 2007, vol. 39, no. 9, pp. 1065-1067.
47. Likhacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Dubatolova T.D., Strunkin D.N., Rogachev V.A., Sebeleva T.E., Erofeev I.S., Bogachev S.S., Yakubov L.A., Shurdov M.A. Integration of human DNA fragments into the cell genomes of certain tissues from adult mice treated with cytostatic cyclophosphamide in combination with human DNA. *Gene Ther. Mol. Biol.*, 2007, vol. 11, pp. 185-202.
48. Likhacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Rogachev V.A., Prokhorovich M.A., Sebeleva T.E., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Exogenous DNA can be captured by stem cells and be involved in their rescue from death after lethal-dose  $\gamma$ -radiation. *Gene Ther. Mol. Biol.*, 2007, vol. 11, pp. 305-314.
49. Lladser A., Mougiakakos D., Tufvesson H., Lichtenberg M.A., Quest A.F., Kiessling R., Ljungberg K. DAI (DLM-1/ZBP1) as a genetic adjuvant for DNA vaccines that promotes effective antitumor CTL immunity. *Mol. Ther.*, 2011, vol. 19, no. 3, pp. 594-601.
50. MacCabe K.M., Hemphill A., Akkari Y., Jakobs P.M., Pauw D., Olson S.B., Mosos R.E., Grompe M. ERCC1 is required for FANCD2 focus formation. *Mol. Genet. Metab.*, 2008, vol. 95, no. 1-2, pp. 66-73.
51. Martin D.A., Elkon K.B. Intracellular mammalian DNA stimulates myeloid dendritic cells to produce type I interferons predominantly through a toll-like receptor 9-independent pathway. *Arthritis Rheum.*, 2006, vol. 54, pp. 951-962.
52. Martinon F., Burns K., Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell*, 2002, vol. 10, no. 2, pp. 417-426.
53. Martinon F., Petrilli V., Mayor A., Tardivel A., Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 2006, vol. 440, no. 7081, pp. 237-241.



54. Martinon F., Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol.*, 2005, vol. 26, no. 8, pp. 447-454.
55. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.*, 1994, vol. 12, pp. 991-1045.
56. Mazur D.J., Perrino F.W. Structure and expression of the TREX1 and TREX2 3' → 5' exonuclease genes. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, no. 18, pp. 14718-14727.
57. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 2007, vol. 449, pp. 819-826.
58. Meylan E., Tschopp J., Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*, 2006, vol. 442, no. 7098, pp. 39-44.
59. Miyahira A.K., Shahangian A., Hwang S., Sun R., Cheng G. TANK-binding kinase-1 plays an important role during in vitro and in vivo type I IFN responses to DNA virus infections. *J. Immunol.*, 2009, vol. 182, no. 4, pp. 2248-2257.
60. Nazmi A., Mukhopadhyay R., Dutta K., Basu A. STING mediates neuronal innate immune response following Japanese encephalitis virus infection. *Sci. Rep.*, 2012, vol. 2, pp. 347.
61. Niedernhofer L.J., Odijk H., Budzowska M., van Drunen E., Maas A., Theil A.F., de Wit J., Jaspers N.G., Boverloo H.B., Hoeijmakers J.H., Kanaar R. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol. Cell Biol.*, 2004, vol. 24, no. 13, pp. 5776-5787.
62. Patel S.J., Jindal R., King K.R., Tilles A.W., Yarmush M.L. The inflammatory response to double stranded DNA in endothelial cells is mediated by NFκB and TNFα. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 5, e19910.
63. Petrilli V., Dostert C., Muruve D.A., Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2007, vol. 19, no. 6, pp. 615-622.
64. Randall R.E., Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.*, 2008, vol. 89, pp. 1-47.
65. Roberts T.L., Idris A., Dunn J.A., Kelly G.M., Burnton C.M., Hodgson S., Hardy L.L., Garceau V., Sweet M.J., Ross I.L., Hume D.A., Stacey K.J. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science*, 2009, vol. 323, no. 5917, pp. 1057-1060.
66. Saito T., Fujita N., Yoshimori T., Akira S. Regulation of dsDNA-induced innate immune responses by membrane trafficking. *Autophagy*, 2010, vol. 6, no. 3, pp. 430-432.
67. Saitoh T., Fujita N., Hayashi T., Takahara K., Satoh T., Lee H., Matsunaga K., Kageyama S., Omori H., Noda T., Yamamoto N., Kawai T., Ishii K., Takeuchi O., Yoshimori T., Akira S. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, vol. 106, no. 49, pp. 20842-20846.
68. Satoh T., Kato H., Kumagai Y., Yoneyama M., Sato S., Matsushita K., Tsujimura T., Fujita T., Akira S., Takeuchi O. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, vol. 107, no. 4, pp. 1512-1517.
69. Shao W., Yeretssian G., Doiron K., Hussain S.N., Saleh M. The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock. *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 282, no. 50, pp. 36321-36329.
70. Sharma S., Fitzgerald K.A. Innate immune sensing of DNA. *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 7, no. 4, p. e1001310.
71. Shi Y., Evans J.E., Rock K.L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, 2003, vol. 425, no. 6957, pp. 516-521.
72. Shirota H., Ishii K.J., Takakuwa H., Klinman D.M. Contribution of interferon-beta to the immune activation induced by double-stranded DNA. *Immunology*, 2006, vol. 118, pp. 302-310.
73. Stetson D.B., Ko J.S., Heidmann T., Medzhitov R. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell*, 2008, vol. 134, no. 4, pp. 587-598.
74. Stetson D.B., Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity*, 2006, vol. 25, no. 3, pp. 373-381.
75. Suzuki K., Mori A., Ishii K.J., Saito J., Singer D.S., Klinman D.M., Krause P.R., Kohn L.D. Activation of target-tissue immune-recognition molecules by double-stranded polynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, pp. 2285-2290.
76. Takaoka A., Taniguchi T. Cytosolic DNA recognition for triggering innate immune responses. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, vol. 60, no. 7, pp. 847-857.
77. Takaoka A., Wang Z., Choi M.K., Yanai H., Negishi H., Ban T., Lu Y., Miyagishi M., Kodama T., Honda K., Ohba Y., Taniguchi T. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*, 2007, vol. 448, no. 7152, pp. 501-505.
78. Takeshita F., Ishii K.J. Intracellular DNA sensors in immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2008, vol. 20, no. 4, pp. 383-388.
79. Tang C.K., Pietersz G.A. Intracellular detection and immune signaling pathways of DNA vaccines. *Expert Rev. Vaccines*, 2009, vol. 8, no. 9, pp. 1161-1670.
80. Tang H.L., Cyster J.G. Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science*, 1999, vol. 284, no. 5415, pp. 819-822.
81. Tian J., Avalos A.M., Mao S.Y., Chen B., Senthil K., Wu H., Parroche P., Drabic S., Golenbock D., Sirois C., Hua J., An L.L., Audoly L., La Rosa G., Bierhaus A., Naworth P., Marshak-Rothstein A., Crow M.K.,

Fitzgerald K.A., Latz E., Kiener P.A., Coyle A.J. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat. Immunol.*, 2007, vol. 8, no. 5, pp. 487-496.

82. Unterholzner L., Keating S.E., Baran M., Horan K.A., Jensen S. B., Sharma S., Sirois C. M., Jin T., Latz E., Xiao T.S., Fitzgerald K.A., Paludan S.R., Bowie A.G. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat. Immunol.*, 2010, vol. 11, no. 11, pp. 997-1004.

83. Viala J., Chaput C., Boneca I.G., Cardona A., Girardin S.E., Moran A.P., Athman R., Memet S., Huerre M.R., Coyle A.J., DiStefano P.S., Sansonetti P.J., Labigne A., Bertin J., Philpott D.J., Ferrero R.L. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat. Immunol.*, 2004, vol. 5, no. 11, pp. 1166-1174.

84. Vilaysane A., Muruve D.A. The innate immune response to DNA. *Semin. Immunol.*, 2009, vol. 21, no. 4, pp. 208-214.

85. Wang Z., Choi M.K., Ban T., Yanai H., Negishi H., Lu Y., Tamura T., Takaoka A., Nishikura K., Taniguchi T. Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, vol. 105, no. 14, pp. 5477-5482.

86. Xiao T. Innate immune recognition of nucleic acids. *Immunol. Res.*, 2009, vol. 43, no. 1-3, pp. 98-108.

87. Xie L., Fang L., Wang D., Luo R., Cai K., Chen H., Xiao S. Molecular cloning and functional characterization of porcine DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors (DAI). *Dev. Comp. Immunol.*, 2010, vol. 34, no. 3, pp. 293-299.

88. Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., Kaisho T., Sanjo H., Takeuchi O., Sugiyama M., Okabe M., Takeda K., Akira S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 2003, vol. 301, no. 5633, pp. 640-643.

89. Yanai H., Ban T., Wang Z., Choi M.K., Kawamura T., Negishi H., Nakasato M., Lu Y., Hangai S., Koshiba R., Savitsky D., Ronfani L., Akira S., Bianchi M. E., Honda K., Tamura T., Kodama T., Taniguchi T. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature*, 2009, vol. 462, no. 7269, pp. 99-103.

90. Yang P., An H., Liu X., Wen M., Zheng Y., Rui Y., Cao X. The cytosolic nuclei acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway. *Nat. Immunol.*, 2010, vol. 11, no. 6, pp. 487-494.

91. Yang Y.G., Lindahl T., Barnes D.E. Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell*, 2007, vol. 131, no. 5, pp. 873-886.

92. Yasuda K., Ogawa Y., Yamane I., Nishikawa M., Takakura Y. Macrophage activation by a DNA/cationic liposome complex requires endosomal acidification and TLR9-dependent and -independent pathways. *J. Leukoc. Biol.*, 2005, vol. 77, pp. 71-79.

93. Yasuda K., Richez C., Uccellini M.B., Richards R.J., Bonegio R.G., Akira S., Monestier M., Corley R.B., Viglianti G.A., Marshak-Rothstein A., Rifkin I.R. Requirement for DNA CpG content in TLR9-dependent dendritic cell activation induced by DNA-containing immune complexes. *J. Immunol.*, 2009, vol. 183, no. 5, pp. 3109-3117.

94. Yi A.K., Tuetken R., Redford T., Waldschmidt M., Kirsch J., Krieg A.M. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Immunol.*, 1998, vol. 160, no. 10, pp. 4755-4761.

95. Yoneyama M., Fujita T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol. Rev.*, 2009, vol. 227, no. 1, pp. 54-65.

96. Yoneyama M., Kikuchi M., Matsumoto K., Imaizumi T., Miyagishi M., Taira K., Foy E., Loo Y.M., Gale M.Jr., Akira S., Yonehara S., Kato A., Fujita T. Shared and unique functions of the DEXD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J. Immunol.*, 2005, vol. 175, no. 5, pp. 2851-2858.

97. Yoneyama M., Kikuchi M., Natsukawa T., Shinobu N., Imaizumi T., Miyagishi M., Taira K., Akira S., Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.*, 2004, vol. 5, no. 7, pp. 730-737.

98. Zhong B., Zhang L., Lei C., Li Y., Mao A.P., Yang Y., Wang Y.Y., Zhang X.L., Shu H.B. The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA. *Immunity*, 2009, vol. 30, no. 3, pp. 397-407.