© Коллектив авторов, 2020

Гурьянова С.В.^{1,2}, Гапонов А.М.^{3,4}, Писарев В.М.^{3,4},
Якушенко Е.В.³, Тутельян А.В.⁵, Александров И.А.³,
Цыпандина Е.В.⁴, Козлов И.Г.^{3,6}

Глюкозаминилмурамилдипептид-кислота (ГМДП-А) модулирует внутриклеточные сигнальные пути натуральных киллерных клеток

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, 117997, г. Москва, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Медицинский институт, 117198, г. Москва, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117198, г. Москва, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 141534, г. Москва, Российская Федерация

⁵ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 111123, г. Москва, Российская Федерация

⁶ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Балтийский федеральный университет им. Э. Канта» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 236041, г. Калининград, Российская Федерация

Резюме

Введение. Лекарственные препараты на основе производных мурамилпептидов на протяжении нескольких десятилетий являются объектом экспериментальных и клинических исследований. Внутриклеточный NOD2-рецептор, ответственный за связывание мурамилдипептида и его производных, остается привлекательной молекулярной мишенью для разработки новых лекарственных средств с известным механизмом действия. Одним из лигандов NOD2 является глюкозаминилмурамилдипептид-кислота (ГМДП-А). В работе впервые исследованы сигнальные механизмы, инициированные в НК-клетках с помощью ГМДП-А.

Материал и методы. Изолированные с помощью магнитной сепарации НК-клетки, выделенные из периферической крови здоровых доноров, инкубировали с 10 мкг/мл ГМДП-А в течение 6 и 16 ч. Уровень экспрессии генов определяли, используя набор Illumina HumanHT-12v4 Expression BeadChip на приборе «Illumina iScan (Illumina, США). Данные статистически обрабатывали с помощью пакета прикладных программ (v 2011.1, Illumina).

Результаты. Обнаружено, что ГМДП-А усиливает транскрипцию ряда генов, продукты которых участвуют в трансдукции сигналов с рецепторов, тем самым обеспечивая поддержание функциональной активности НК-клеток. ГМДП-А индуцирует синтез транскриптов MAPK-сигнального пути, сигнальных медиаторов VAV2, сигнального адаптора CRKL, усиливает синтез транскриптов генов регуляторной субъединицы 3(γ) фосфоинозитид-3-киназы и фосфолипазы C B1, контролирующей обмен фосфолипидов, активирует клетки организма при дефектах клеточного звена иммунитета. ГМДП-А значительно повышает уровень экспрессии следующих ключевых генов, связанных с контролем механизмов прямой и антителоопосредованной цитотоксической активности НК-клеток: *CRKL*, *VAV2*, *ZAP70*, *RAP1A*, *PLCB1*, *FCGR3A*, семейство *MAPK*, *IFNA1*, *TNFRSF9*, *TNFSF14*.

Заключение. Экспериментальные данные позволяют заключить, что ГМДП-А может быть эффективным средством противодействия ранним этапам онкогенной и вирусной трансформации НК-клетками, ключевыми клетками врожденного иммунитета.

Для корреспонденции
Гурьянова Светлана Владимировна –
кандидат биологических наук,
научный сотрудник ИБХ РАН,
Москва, Российская Федерация
E-mail: svgur@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6186-2462>

Ключевые слова: натуральные киллерные клетки; глюкозаминилмурамилдипептид-кислота; транскриптом; MAPK-сигнальный путь; интерферон; противоинфекционный иммунитет; противоопухолевый иммунитет

Статья поступила 05.03.2020. Принята в печать 16.04.2020.

Для цитирования: Гурьянова С.В., Гапонов А.М., Писарев В.М., Якушенко Е.В., Тутельян А.В., Александров И.А., Цыпандин Е.В., Козлов И.Г. Глюкозаминилмурамилдипептид-кислота (ГМДП-А) модулирует внутриклеточные сигнальные пути натуральных киллерных клеток. Иммунология. 2020; 41 (3): 235–248. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-235-248

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Guryanova S.V.^{1,2}, Gaponov A.M.^{3,4}, Pisarev V.M.^{3,4}, Yakushenko E.V.³,
Tutelyan A.V.⁵, Alexandrov I.A.³, Tsipandina E.V.⁴, Kozlov I.G.^{3,6}

Glucosaminylmuramyl dipeptide acid (GMDP-A) modulates intracellular signaling pathways in natural killer cells

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences, Ministry of Science and High Education of Russian Federation, 117997, Moscow, Russian Federation

² Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Medical Institute, Ministry of Science and High Education of Russian Federation, 117198, Moscow, Russian Federation

³ Dmitry Rogachev National Medical Scientific Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of Russian Federation, 117198, Moscow, Russian Federation

⁴ Federal Scientific and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation, Ministry of Healthcare of Russian Federation, 141534, Moscow, Russian Federation

⁵ Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), 111123, Moscow, Russian Federation

⁶ Immanuel Kant Baltic Federal University, Ministry of Science and High Education of Russian Federation, 236041, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract

Introduction. Medicines developed as derivatives of muramyl peptides have been the subject of experimental and clinical studies for several decades. The intracellular NOD2- receptor responsible for the binding of muramyl dipeptide and its derivatives remains an attractive molecular target for the development of new drugs with a known mechanism of action. GMDP-A belongs to one of the NOD2-receptor ligands. In this study signaling mechanisms initiated by GMDP-A were characterized for the first time in natural killer (NK) cells.

Material and methods. NK cells isolated by magnetic separation from peripheral blood of healthy donors were incubated with 10 µg/ml GMDP-A for 6 hours and 16 hours. The levels of genes expression were determined using the Illumina HumanHT-12v4 Expression BeadChip kit and Illumina iScan instrument (Illumina, USA). The data were statistically processed using an application software package (v 2011.1, Illumina).

Results. It was found that GMDP-A enhanced the transcription of a number of genes associated with transduction of signals from receptors, thereby ensuring the maintenance of the functional activity of NK cells. GMDP-A induced the synthesis of transcripts of the MAPK signaling pathway, VAV2 signal mediators, the CRKL signal adapter, enhanced the synthesis of transcripts of the regulatory subunit 3 (γ) phosphoinositide-3-kinase and phospholipase C B1 genes that control phospholipid metabolism, activated the cells with defects in the cellular immunity link. GMDP-A significantly increases the expression level of the following key genes associated with the control of the mechanisms of direct and antibody-mediated cytotoxic activity of NK cells: *CRKL*, *VAV2*, *ZAP70*, *RAP1A*, *PLCB1*, *FCGR3A*, the *MAPK* family, *IFNA1*, *TNFRSF9*, *TNFSF14*.

Conclusion. Experimental data justify the high potential of the GMDP-A to counteract altered recognition of the early stages of oncogenic and viral transformation by key cells of the innate immunity, the NK cells.

Keywords: natural killer cells; glucosaminyl muramyl dipeptide acid; transcriptome; MAPK signaling pathway; interferon; anti-infection immunity; anti-tumor immunity

Received 05.03.2020. Accepted 16.04.2020.

For citation: Guryanova S.V., Gaponov A.M., Pisarev V.M., Yakushenko E.V., Tutelyan A.V., Aleksandrov I.A., Tsipandina E.V., Kozlov I.G. Glucosaminylmuramyl dipeptide acid (GMDP-A) modulates the intracellular signaling pathways of natural killer cells. *Immunologiya*. 2020; 41 (3): 235–48. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-235-248 (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

For correspondence

Svetlana V. Guryanova –
PhD, Research Scientist,
Shemyakin-Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry
of Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation
E-mail: svgur@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6186-2462>

Введение

Одно из мировых направлений разработок лекарственных средств с противоопухолевой активностью — препараты на основе производных мурамилпептидов (МП), обладающих целым рядом преимуществ: известным механизмом действия и наличием специфического рецептора; относительно небольшим размером молекул (менее 1 кДа), которые могут быть получены синтетическим путем; малой токсичностью и отсутствием тяжелых побочных эффектов; относительно невысокой стоимостью производства субстанции и конечного продукта. МП являются минимальными структурными компонентами пептидогликана клеточной стенки всех известных бактерий, реализующих свою биологическую активность посредством связывания со специфическими NOD-рецепторами, локализованными внутри клеток. NOD-рецепторы относятся к NLR (NOD-like receptor) — семейству рецепторов врожденного иммунитета. Их связывание с МП приводит к активации NF-κB-сигнального пути и, как следствие, к синтезу цитокинов, которые активируют функции клеток противоинфекционной и противоопухолевой защиты, а также гемопоэза. Белки NOD экспрессируются главным образом иммунными клетками, в том числе макрофагами, гранулоцитами, дендритными клетками и натуральными киллерными (НК)-клетками, а также и различными типами неиммунных клеток.

Глюкозаминилмурамилдипептид-кислота (ГМДП-А) — модифицированный аналог ГМДП, который является субстанцией лекарственного средства Ликопид® (АО «Пептек», Российская Федерация) и более 25 лет используется в качестве лекарственного средства для коррекции иммунодефицитных состояний [1–3]. ГМДП-А имеет ряд преимуществ в сравнении с ГМДП — менее выраженная пирогенность, широкий диапазон активных концентраций [4] и увеличенный период полувыведения, что расширяет его терапевтические возможности и позволяет использовать в виде инъекционной лекарственной формы. Научный и практический интерес представляет исследование влияния ГМДП-А на функционирование НК-клеток для определения дальнейших стратегий и способов применения ГМДП-А в качестве лекарственного средства.

НК-клетки — одни из ключевых клеток иммунной системы, они имеют решающее значение в иммунном ответе на возбудителей инфекции и злокачественные опухоли. НК-клетки дифференцируются из общего для Т- и В-клеток лимфоидного предшественника, но в отличие от последних, высвобождают цитотоксические эффекторские молекулы непосредственно при встрече с инфицированной или трансформированной клеточной мишенью. НК-клетки, обнаруженные более 40 лет назад, являются крупными гранулярными лимфоцитами, способными убивать клетки-мишени без предварительной сенсibilизации, не затрагивая при этом здоровые аутологичные клетки. НК-клетки относят к системе врожденного иммунитета, поскольку при их созревании не происходит перестройки генов рецепторного аппарата.

НК-клетки распознают своими рецепторами молекулы МНС I класса, в норме представленные на всех ядросодержащих клетках. В инфицированных и опухолевых клетках молекулы МНС I класса отсутствуют или трансформированы, что является необходимым, но недостаточным сигналом для цитотоксического действия НК. Для уничтожения собственных измененных клеток организма, кроме отсутствия молекул МНС I класса, необходимо дополнительное распознавание НК-клетками молекул, индуцируемых клеточным стрессом, появляющихся в процессе малигнизации или инфицирования [5]. Распознавание НК-клетками молекул МНС I класса на аутологичных нормальных клетках происходит с помощью нескольких типов рецепторов: так называемых ингибиторных Ig-подобных рецепторов (KIR), Ig-подобных рецепторов лейкоцитов подсемейства B1 (LILRB1) и лектиновых рецепторов типа C — гетеродимерного комплекса CD94-NKG2A. Взаимодействие этих рецепторов с нормальными молекулами МНС I приводит к генерации ингибирующих сигналов, предотвращающих уничтожение аутологичных здоровых клеток. Инфицированные и опухолевые клетки часто подавляют экспрессию молекул МНС I класса, чтобы избежать узнавания цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ), но это приводит к их уязвимости перед НК-клетками. В этом случае НК-клетки взаимодействуют с клетками-мишенями с недостаточной экспрессией молекул МНС I класса, а их специфические ингибирующие рецепторы не могут распознавать свои лиганды, следствием чего является активация НК-клеток через их активирующие рецепторы с последующим уничтожением клеток-мишеней. Таким образом, НК-клетки могут эффективно уничтожать опухолевые и инфицированные клетки, которые перестали экспрессировать молекулы МНС I класса [6]. Активирующими рецепторами являются рецепторы цитотоксичности (NKG2D, CD94-NKG2C) и Ig-подобные рецепторы (2B4). Каждая НК-клетка обычно экспрессирует от двух до четырех ингибирующих рецепторов в дополнение к многочисленным рецепторам активации. Популяция НК-клеток в значительной степени гетерогенна, поскольку НК-клетки экспрессируют различные комбинации ингибирующих или активирующих рецепторов. Многообразие таких комбинаций определяет способность НК-клеток реагировать на различные стимулы и участвовать в иммунных ответах при различных патологических процессах. Кроме ингибирующих и активирующих рецепторов, НК-клетки несут на поверхности рецепторы цитокинов, гормонов и нейромедиаторов. Такой широкий набор рецепторов позволяет НК-клеткам первыми воспринимать сигналы об инфицировании вирусами или опухолевой трансформации клетки на ранних стадиях и уничтожать пораженную клетку, предотвращая тем самым дальнейшее развитие патологического процесса или распространение патогена.

НК-клетки классифицируют на две подгруппы в зависимости от их фенотипа и функций: CD56^{dim} и CD56^{bright}.

CD56^{dim} составляют 90 % общей популяции НК-клеток в периферической крови и экспрессируют низкоаффинный рецептор Fc-фрагмента IgG – FcRIIIa/CD16a. Функционально CD56^{dim} обладают высокой цитотоксичностью. Примерно 10 % НК-клеток принадлежат к CD56^{bright}-клеткам, преимущественно участвующим в продукции цитокинов. НК-клетки вторичной лимфоидной ткани (миндалины, лимфатические узлы и селезенка) отличаются от НК-клеток в периферической крови, так как они активируются дендритными клетками и секретируют цитокины, например, интерферон (ИФН), который стимулирует ЦТЛ-ответ [7].

Лизис клеток-мишеней НК-клетками преимущественно обеспечивается перфорином, гранулизином и гранзимами – белками, которые хранятся в так называемых литических гранулах, а при взаимодействии НК-клетки с клеткой-мишенью выбрасываются в результате дегрануляции. Гранзимы, попав при помощи перфорина в цитозоль клетки-мишени, индуцируют ее апоптоз. Меньший вклад в киллерную функцию НК-клеток вносят поверхностные молекулы семейства фактора некроза опухолей (ФНО), например FasL/CD178 и TRAIL/CD253, которые вызывают рецептор-зависимый апоптоз мишеней. Мишенями НК-клеток могут являться не только эукариотические клетки. Показано, что секретируемые НК-клетками гранзимы способны индуцировать микроптоз – процесс, подобный апоптотической гибели, – в бактериальных клетках (*E. coli*), паразитах (*Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *L. major*), тогда как гранулизин, нарушая мембрану микроба, способствует его некрозоподобной гибели [8]. 90 % НК-клеток экспрессируют рецепторы практически для всех цитокинов. Наиболее значимыми для активации НК-клеток являются рецепторы ИФН-α и интерлейкинов (ИЛ)-12, ИЛ-15 и ИЛ-18. Во время дифференцировки НК-клеток экспрессия некоторых цитокиновых рецепторов может уменьшаться. В то же время дифференцировка НК-клеток не влияет на стабильную экспрессию ими ИФН-γ.

Функциональная классификация биологических процессов и анализ геной онтологии (GO) показали, что гены, связанные с реализацией иммунных функций НК-клеток, составляют около 7 %, в то время как гены, связанные с клеточными и метаболическими процессами жизнеобеспечения, составляют большинство дифференциально экспрессируемых генов – 31 %. В связи с этим представляет интерес исследование экспрессии генов не только рецепторных структур и секретируемых цитокинов, но и генов белков метаболических путей, изменяющихся при действии МП.

Цитозольные Crk и Crk-подобные (CrkL – Crk-like) факторы являются членами семейства, связывающими тирозин-фосфорилированные белки с широко экспрессируемыми адаптерами, которые взаимодействуют с различными белками для выполнения ключевых ролей в путях сигнальной трансдукции, запускаемых активацией рецепторных и нерецепторных тирозинкиназ. Фактор Crk рекрутирует к цитоплазматической мем-

бране белки, участвующие в передаче сигнала, CrkL активирует сигнальные пути Ras- и Jun-киназ, является субстратом тирозинкиназы BCR-ABL и контролирует функцию НК-клеток посредством регуляции накопления активирующих рецепторов и фосфорилированных молекул Vav-1 в иммунологических синапсах [9]. Таким образом, Crk и CrkL играют критическую роль в клеточной структуре и подвижности, поддерживают целостность цитоскелета, регулируют цитотоксические функции, а также синтез цитокинов, в частности – ИФН-γ.

Тирозинкиназа Fyn семейства Src участвует в регуляции клеточного роста и в перфорин-зависимом уничтожении инфицированных клеток НК-клетками [10]. Нерецепторные тирозинкиназы Syk и Zap-70 являются членами семейства тирозинкиназ SYK. Эти цитоплазматические тирозинкиназы имеют общий двойной домен SH2, разделенный линкерным доменом. Активация Syk в меньшей степени зависит от фосфорилирования киназами семейства Src, чем Zap-70. Syk и Zap-70 передают сигналы от поверхностных рецепторов, включая CD74, Fc-рецептор и интегрины. Активация Syk происходит посредством связывания двух доменов SH2 с ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif), остатки тирозина фосфорилируются киназами семейства Src. Связывание с фосфорилированным ITAM освобождает Syk от внутримолекулярного аутоингибирования и запускает его ассоциацию с рецепторными сигнальными молекулами, опосредованную ITAM-содержащим адаптером.

Малая ГТФаза RAC1 участвует в разнообразных динамических клеточных биологических процессах, включая пролиферацию клеток, выживание клеток, межклеточные контакты, эпителиально-мезенхимальный переход (EMT), подвижность клеток и инвазивность. Эти процессы организуются посредством тонкой настройки активности RAC1 с помощью рецепторов и эффекторов клеточной поверхности, которые регулируют циклический переход RAC1-GDP (в выключенном состоянии)/RAC1-GTP (во включенном состоянии). RAC1 инициирует серию сигнальных сетей, включая регуляторный комплекс ремоделирования актинового цитоскелета, активацию протеинкиназ (PAKs, MAPKs) и факторов транскрипции (NF-κB, Wnt/β-catenin/TCF, STAT3, Snail), продукцию реактивного кислорода (NADPH-оксидазы, митохондриальные АФК). Таким образом, эта ГТФаза может проявлять воздействие на разных стадиях прогрессирования опухоли от дисплазии до метастатического каскада [11].

RAP-белки (RAP1, RAP2A, B, C) являются низкомолекулярными ГТФазами семейства RAS. Через различные сигнальные пути они опосредуют клеточную адгезию, пролиферацию, активацию генов и другие клеточные события. Активация RAP-сигнала жестко регулируется несколькими специфическими регуляторными белками, включая факторы обмена гуаниновых нуклеотидов и белки, активирующие ГТФазы. В иммунной и гемопоэтической системах RAP-сигнал играет решающую роль в развитии и функциониро-

нии практически всех линий лимфоцитов и гемопоэтических клеток. Важно отметить, что, нарушение регуляции RAR-сигнала может приводить к патологическим состояниям, в том числе лейкозам и аутоиммунным реакциям. Транслокация в ядро активных ГТФ-форм этих белков обнаружена при различных онкологических заболеваниях, в том числе при плоскоклеточном раке. Регуляция RAR-сигналов предоставляет потенциальную возможность контроля заболеваний человека, в том числе злокачественных [12].

Белки семейства Vav являются факторами обмена гуаниновых нуклеотидов для семейства Rho/Rac малых ГТФ-связывающих белков. Кроме того, они имеют домены, которые опосредуют белок-белковые взаимодействия, включая один SH2-домен и два SH3-домена. Vav1, Vav2 и Vav3 играют решающую роль в регуляции изоформ фосфолипазы C γ (PLC gamma) с помощью рецепторов, связанных с ITAM, который активирует пути, ведущие к связанной с белком актином цитоскелетной перестройке и транскрипционным изменениям [13].

Ген *PLCB1* кодирует 1-фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-фосфодиэстеразу b-1 – фермент, который катализирует образование инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерина из фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата. Эта реакция использует кальций в качестве кофактора и играет важную роль во внутриклеточной трансдукции многих внеклеточных сигналов.

Фосфоинозитид-3-киназы PI3K осуществляют обмен фосфата в инозитол-фосфолипидах в составе плазматической мембраны и координирует выживание, пролиферацию и миграцию НК-клеток [14]. PIK3R1 и PIK3R3 являются изоформами регуляторных субъединиц фосфоинозитид-3-киназы PI3K класса I, регулирующих каталитическую субъединицу PI3K-комплекса в клетках, включая трансформированные НК-клетки. Другая субъединица – PIK3C2G – фосфатидилинозитол-4-фосфат-3-киназа, каталитическая субъединица типа 2 γ , входящая в состав комплекса PI3K класса II, в отличие от широко представленных в различных тканях белков PI3K класса I и других белков класса II экспрессируется преимущественно в ограниченных компартментах – печени, поджелудочной железе, молочной железе, тонком кишечнике, предстательной железе. Известно об этой форме мало, однако единичные данные показали, что PIK3C2G экспрессируется в эндосомах и участвует в контроле клеточного метаболизма [15]. Данных об экспрессии этой формы белков PI3K в НК-клетках нет.

Продукты генов *FCGR* принадлежат к трем группам рецепторов: рецептор с высоким сродством (FCGR1) и две группы рецепторов с низким сродством (FCGR2 и FCGR3). У человека ген *FCGR3A* кодирует Fc-рецептор IIIa с низкой аффинностью (CD16a), являющийся частью кластера дифференцировки – молекулярного комплекса клеточной поверхности. Молекула CD16 является одним из наиболее мощных активационных рецепторов НК-клеток и представляет собой трансмембранный белок суперсемейства иммуноглобулинов.

У человека CD16 является низкоаффинным рецептором Fc-фрагментов антител субклассов IgG1 и IgG3. Существуют две изоформы этого антигена – CD16a (FCGR3A) и CD16b (FCGR3B), причем НК-клетки экспрессируют только первую из них. Антитела субклассов IgG1 и IgG3 играют роль опсоинов, своими Fab-фрагментами взаимодействуя с поверхностными антигенами клеток-мишеней, а Fc-фрагментами – с CD16, что индуцирует литическую атаку НК-клеток против мишеней, покрытых антителами, в реакции антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ). Активационный сигнал от CD16 передается через Src-киназы, которые фосфорилируют ITAM-мотивы адапторных белков CD3Z, и FcsRy, которые, в свою очередь, привлекают и активируют тирозинкиназы Syk и Zap-70. Мутации гена *FCGR3A* вызывают дефицит НК-клеток и ассоциированы с онкогенными вирусными инфекциями, которые могут способствовать развитию рака [16]. Генетический полиморфизм *FCGR3A* ассоциируется с чувствительностью к блокаторам ФНО при спондилоартрите, псориазе и болезни Крона [17]. Оценка экспрессии данного гена в НК-клетках имеет большое значение в диагностике, а также в профилактике и терапии аутоиммунных и онкологических заболеваний.

Фосфатидилинозитол-специфические ферменты фосфолипазы C (β и γ) катализируют гидролиз фосфолипидов. Они активируются рецепторными и нерецепторными тирозинкиназами и являются наиболее известными фосфолипазами по их роли в передаче сигналов липидов и пролиферации клеток.

ИФН представляют собой семейство цитокинов с мощными противовирусными, антипролиферативными и иммуномодулирующими свойствами. На основании их взаимодействия с конкретным рецептором клеточной поверхности различают три основных типа ИФН: I, II и III. У человека существует 13 различных генов, кодирующих ИФН- α , обозначаемых как *IFNA1*, *IFNA2*, *IFNA4*, *IFNA5*, *IFNA6*, *IFNA7*, *IFNA8*, *IFNA10*, *IFNA13*, *IFNA14*, *IFNA16*, *IFNA17* и *IFNA21* [18].

Члены семейства белков передачи сигналов и активаторов транскрипции STAT участвуют в регуляции транскрипции и способны значительно изменять процессы пролиферации, апоптоза и дифференцировки клеток. В основном они активируются мембранными рецептор-ассоциированными киназами Janus (JAK). Нарушение этого пути часто наблюдается в первичных опухолях и приводит к усилению ангиогенеза, что повышает выживаемость опухолей и иммуносупрессию. Исследования с использованием нокаута генов доказали, что белки STAT участвуют в развитии и функционировании иммунной системы и играют роль в поддержании иммунной толерантности [19].

Еще одна группа участников сигнальных механизмов пострецепторного этапа передачи – это митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК), первоначально называемые ERK, которые представляет собой цепочку регуляторных белков в клетке. По этой цепочке пере-

дается сигнал от рецептора на поверхности мембраны клетки в ядро с последующей активацией транскрипции. Белки сигнального пути регулируют активность друг друга путем присоединения фосфатных групп к соседнему белку (фосфорилирование белка), «включая» или «выключая» его таким образом. Мутация одного из белков МАРК-пути разрушает правильное прохождение сигнала от рецептора и провоцирует развитие многих видов рака [20].

Семейство ФНО объединяет целый ряд различных трансмембранных белков с гомологичным доменом ФНО. Основная роль ФНО заключается в регуляции иммунных клеток, влиянии на липидный метаболизм и коагуляцию, устойчивость к инсулину, функционирование эндотелия, стимуляцию провоспалительных цитокинов, ИФН- γ . Молекулы семейства ФНО и их рецепторы относятся к важнейшим факторам врожденного иммунитета, защищающим от внутриклеточных паразитов, вирусов и трансформированных клеток [21]. Имеются данные о том, что один из механизмов противоопухолевого действия НК-клеток связан с эффектами их мембраноассоциированных или секретируемых молекул ФНО и ИФН- γ , обеспечивающих ремоделирование микроокружения опухоли и дифференцирование клеток рака [22].

Эффекторные функции НК-клеток во многом зависят от активации/деактивации многочисленных внутриклеточных протеинкиназ путем их фосфорилирования/дефосфорилирования, трансдукции сигнала от рецепторов через цитозольные белки в ядро при участии тирозинкиназ, фосфолипаз, адаптерных белков [9, 10]. Поэтому исследования, направленные на выяснение того, какие именно сигнальные механизмы активируются при действии ГМДП-А на НК-клетки, помогут оценить потенциал препарата как регулятора дифференцировки и созревания НК-клеток, их цитотоксической и секреторной активности.

Материал и методы

Мураamilпептид. N-ацетил-D-глюкозаминил-(b1→4)-N-ацетилмураamil-L-аланил-D-изоглютаминная кислота (ГМДП-А) был синтезирован в компании АО «Пептек» (Российская Федерация) согласно разработанным ранее методам [23, 24].

Выделение моноцитов периферической крови здоровых доноров. Мононуклеарные клетки (МНК) получали из периферической крови условно здоровых добровольцев мужского пола в возрасте от 24 до 35 лет. Образцы крови были получены из отделения трансфузиологии НМИЦ «ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва) после предварительного тестирования в соответствии с протоколом заготовки препаратов донорской крови.

Венозную кровь, стабилизированную K_3 ЭДТА, смешивали с равным объемом фосфатного буфера, настилали на градиент плотности фиколла-верографина (1,077) и центрифугировали 25 мин при 1000g при комнатной температуре. После окончания центрифугирова-

ния клетки, собранные на границе градиента плотности, ресуспендировали в среде RPMI-1640 без сыворотки и центрифугировали 8 мин при 200g. Процедуру повторяли еще дважды. Выделенные и отмытые МНК ресуспендировали в среде RPMI-1640, содержащей 2 mM L-глутамин, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone Laboratories, Inc., США) и 40 мкг/мл гентамицина (полная среда), после чего подсчитывали в камере Горяева.

Выделение НК-клеток из МНК методом магнитной сепарации. Фракцию НК-клеток выделяли из МНК с помощью магнитной сепарации, используя МНК и наборы NK Cell Isolation Kit, Human (Miltenyi Biotec, Германия) согласно инструкции производителя. Выделенные клетки осаждали центрифугированием при 200g в течение 8 мин. Осадок клеток ресуспендировали в полной среде RPMI-1640, подсчитывали и вносили в лунки 24-луночного планшета в концентрации 5×10^5 клеток на 1 мл полной среды. С помощью проточной цитофлуориметрии установили, что чистота выделенной популяции НК-клеток (CD3-CD19-CD56⁺) составляла 95 %.

ГМДП-А вносили в объеме не более 1 % от общего объема среды культивирования в концентрации 10 мкг/мл. В контрольные лунки вносили эквивалентный объем полной среды. После внесения препарата клетки инкубировали при 37 °C в атмосфере, содержащей 5 % CO₂, в течение 6 и 16 ч.

Выделение РНК и реакция обратной транскрипции. По окончании культивирования из лунок осторожно удаляли 0,4 мл среды культивирования и добавляли 0,8 мл Trizol Reagent (Invitrogen, США). Далее следовали протоколу производителя. Сразу после выделения суммарной РНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием набора Ambion Total-Prep cRNA Amplification Kit (Invitrogen, США) согласно прилагаемого к набору протокола.

Исследование экспрессии генов. Уровень экспрессии генов исследовали с использованием набора Illumina HumanHT-12v4 Expression BeadChip на приборе Illumina iScan (Illumina, США) согласно протоколу производителя. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ Genome Studio software (v 2011.1, Illumina, США). Гены и их условные обозначения представлены в табл. 1.

Результаты

Исследована экспрессия 48 генов, ответственных за синтез цитокинов, мембранных рецепторов, адаптерных белков, регулирующих клеточный метаболизм в НК-клетках, изолированных из МНК 5 доноров. Результаты сравнения уровней экспрессии генов в образцах НК-клеток человека, подвергшихся в течение 6 и 16 ч (экспериментальная группа) и не подвергшихся (контрольная группа) воздействию ГМДП-А, представлены в табл. 2.

Как видно на рис. 1, экспрессия гена *CRKL* под действием ГМДП-А достоверно повышается на 48–70 %

Таблица 1. Описание исследованных генов

Ген	Описание кодируемого продукта
<i>CRK</i>	Член семейства белков, связывающих тирозинфосфорилированные белки
<i>CRKL</i>	Crk-подобный белок – субстрат тирозинкиназы BCR-ABL
<i>FYN</i>	Тирозинкиназа семейства Src
<i>SYK</i>	Нерецепторная тирозинкиназа
<i>ZAP70</i>	Ассоциированная с ζ-цепью (TCR) протеинкиназа 70 кДа
<i>RAC3</i>	Малый ГТФ-связывающий белок семейства Rho
<i>RAC2</i>	Малый ГТФ-связывающий белок семейства Rho
<i>RAC1</i>	Малый ГТФ-связывающий белок семейства Rho
<i>RAP1A</i>	Член семейства Ras малых ГТФ-связывающих белков
<i>RAPGEF1</i>	Фактор обмена Рарап-гуаниновых нуклеотидов (GEF) 1
<i>RAP2A</i>	RAP2A, член семейства онкогенов RAN
<i>VAV1</i>	Vav-1 – фактор обмена гуаниновых нуклеотидов
<i>VAV2</i>	Vav-2 – фактор обмена гуаниновых нуклеотидов
<i>VAV3</i>	Vav-3 – фактор обмена гуаниновых нуклеотидов
<i>PLCB1</i>	Фосфолипаза C, β1 (фосфоинозитид-специфичная)
<i>FCGR3A</i>	FcRIIIa, рецептор Fc-фрагмента IgG, низкое сродство (CD16a)
<i>PLCG1</i>	Фосфолипаза C, γ 1
<i>PLCG2</i>	Фосфолипаза C, γ 2
<i>PIK3R3</i>	Фосфоинозитид-3-киназа, регуляторная субъединица 3 (γ)
<i>PIK3R1</i>	Фосфоинозитид-3-киназа, регуляторная субъединица 1 (α)
<i>PIK3C2G</i>	Фосфатидилинозитол-4-фосфат-3-киназа, каталитическая субъединица типа 2γ
<i>IFNA1</i>	ИФН-α1
<i>IFNA6</i>	ИФН-α6
<i>IFNAR1</i>	Рецептор ИФН (α, β и ω) 1
<i>IFNA21</i>	ИФН-α21
<i>STAT2</i>	Преобразователь сигнала и активатор транскрипции 2, 113 кДа
<i>STAT5A</i>	Преобразователь сигнала и активатор транскрипции 5A
<i>STAT6</i>	Преобразователь сигнала и активатор транскрипции 6, индуцированный ИЛ-4
<i>MAPK8IP1</i>	МАРК 8, взаимодействующий белок 1
<i>MAP2K7</i>	МАРК-киназа 7
<i>MAP4K2</i>	МАРК-киназа 2
<i>MAP3K6</i>	МАРК-киназа 6
<i>MAPKAPK5</i>	МАРК 5
<i>MAPK8</i>	МАРК 8
<i>MAP3K14</i>	МАРК-киназа 14
<i>MAPKAPK3</i>	МАРК 3
<i>MAPK13</i>	МАРК 13
<i>MAP3K10</i>	МАРК-киназа 10
<i>MAPK10</i>	МАРК 10
<i>MAP2K2</i>	МАРК-киназа 2
<i>MAP4K3</i>	МАРК-киназа 3
<i>TNFRSF9</i>	Суперсемейство рецепторов ФНО, член 9
<i>TNFRSF10B</i>	Суперсемейство рецепторов ФНО, член 10
<i>TNFRSF13C</i>	Суперсемейство рецепторов ФНО, член 13
<i>TNFRSF14</i>	Суперсемейство рецепторов ФНО, член 14
<i>TNFSF18</i>	Суперсемейство ФНО (лиганд), член 18
<i>TNFAIP6</i>	ФНОα-индуцированный белок 6

в первые 6 ч и сохраняет повышенные значения на протяжении 16 ч, при этом экспрессия гена *CRK* остается без изменений.

Данные табл. 2 показывают, что уровень экспрессии гена *FYN*, кодирующего тирозинкиназу семейства Src, которая участвует в регуляции клеточного роста

и в перфорин-зависимом уничтожении инфицированных НК-клеток, не изменялся под действием ГМДП-А. Экспрессия гена *SYK*, кодирующего другую тирозинкиназу, которая участвует в передаче сигнала от нескольких мембранных рецепторов, под влиянием ГМДП-А уменьшалась почти в два раза. Этот эффект был непро-

Таблица 2. Экспрессия генов в НК-клетках под влиянием ГМДП-А (10 мкг/мл)

Ген	Образец 1		Образец 2		Образец 3		Образец 4		Образец 5	
	время инкубации с ГМДП-А (10 мкг/мл), ч									
	6	16	6	16	6	16	6	16	6	16
CRKL	1,67*	1,41*	1,56*	1,26	1,72*	1,41*	1,70*	1,48*	1,47*	1,37
CRK	1,06	1,19	1,06	1,12	1,11	1,13	1,23	1,20	1,06	0,95
FYN	1,05	1,21	0,93	1,17	0,98	1,19	1,16	1,28	0,87	1,08
SYK	0,47*	0,87	0,45*	0,71	0,61*	0,82	0,50*	0,98	0,49*	0,84
ZAP70	0,82	1,56*	0,82	1,44*	0,94	1,61*	1,04	1,67*	0,83	1,45*
RAC3	1,26	1,63*	0,98	1,58*	1,10	1,62*	1,28	1,82*	0,93	1,39
RAC2	1,21	1,06	1,11	1,06	1,13	1,14	1,34	1,07	1,17	1,03
RAC1	0,78	0,79	0,69	0,60	0,74	0,65	0,93	0,91	0,72	0,74
RAP1A	1,19	1,68*	1,05	1,62*	1,31	1,67*	1,40	1,79*	1,22	1,68*
RAPGEF1	1,21	1,46*	1,16	1,37	1,34	1,47*	1,28	1,47*	1,01	1,15
RAP2A	1,48*	1,41	1,29	1,33	1,30	1,44*	1,72*	1,42*	1,41*	1,34
VAV3	0,84	1,91*	0,81	1,89*	0,84	1,97*	0,99	1,98*	0,72	1,91*
VAV2	1,31	1,56*	1,29	1,51*	1,31	1,78*	1,32	1,58*	1,27	1,38
VAV1	0,54*	0,59*	0,47*	0,37*	0,58*	0,43*	0,55*	0,67	0,36*	0,46*
PLCB1	1,07	2,38*	0,95	2,21*	0,99	2,44*	1,11	2,43*	0,91	2,14*
FCGR3A	1,13	2,02*	0,98	1,82*	1,02	1,94*	1,18	2,11*	0,97	1,77*
PLCG1	0,82	1,29	0,78	1,14	0,98	1,17	0,95	1,30	0,84	1,14
PLCG2	0,55*	0,39*	0,46*	0,37*	0,46*	0,41*	0,55*	0,44*	0,41*	0,20*
PIK3R3	1,92*	2,07*	1,79*	2,04*	1,85*	2,09*	1,94*	2,09*	1,75*	2,04*
PIK3R1	1,06	1,66*	1,03	1,54*	1,11	1,55*	1,21	1,66*	1,04	1,57*
PIK3C2G	1,46*	1,37	1,34	1,24	1,44*	1,29	1,67*	1,40	1,47	1,21
IFNA1	1,45*	2,34*	1,26	2,23*	1,26	2,28*	1,48*	2,36*	1,32	2,25*
IFNA6	1,52*	2,02*	1,47*	1,99*	1,55*	2,18*	1,54*	2,13*	1,47*	2,04*
IFNAR1	1,24	1,83*	1,21	1,72*	1,43*	2,00*	1,43*	1,85*	1,19	1,78*
IFNA21	0,65	1,70*	0,45*	1,69*	0,60	1,76*	0,67	1,74*	0,52*	1,72*
STAT6	1,04	2,33*	0,81	2,30*	0,91	2,32*	1,10	2,41*	0,93	2,31*
STAT5A	1,29	1,64*	1,00	1,49*	1,00	1,72*	1,42*	1,74*	1,18	1,52*
STAT2	0,92	1,47*	0,92	1,44*	1,08	1,52*	1,08	1,50*	0,97	1,43*
MAPK8IP1	1,10	2,74*	0,87	2,55*	0,96	2,65*	1,15	2,76*	0,90	2,51*
MAP2K7	2,32*	2,37*	2,21*	2,26*	2,26*	2,51*	2,41*	2,42*	2,22*	2,23*
MAP4K2	1,22	2,16*	1,20	2,15*	1,25	2,40*	1,28	2,18*	1,23	1,95*
MAP3K6	1,79*	2,13*	1,76*	2,10*	1,84*	2,13*	1,92*	2,19*	1,82*	2,14*
MAPKAPK5	0,59	2,03*	0,54	2,01*	0,57	2,01*	0,72	2,10*	0,43*	1,95*
MAPK8	0,66	1,84*	0,45*	1,74*	0,61	1,77*	0,78	1,86*	0,48*	1,75*
MAP3K14	0,76	1,84*	0,71	1,75*	0,94	1,82*	1,03	1,88*	0,74	1,83*
MAPKAPK3	1,38	1,80*	1,37	1,76*	1,38	1,81*	1,39	1,88*	1,38	1,71*
MAPK13	1,51*	1,79*	1,49*	1,74*	1,57*	1,81*	1,60*	1,81*	1,51*	1,77*
MAP3K10	0,89	1,59*	0,75	1,52*	0,79	1,52*	0,91	1,66*	0,78	1,54*
MAPK10	1,08	1,53*	0,95	1,36*	1,12	1,36*	1,11	1,61*	0,79	1,34*
MAP2K2	0,84	1,46*	0,84	1,37*	1,04	1,45*	0,96	1,48*	0,91	1,22*
MAP4K3	1,19	1,41*	1,09	1,32*	1,11	1,36*	1,34	1,53*	1,06	1,34*
TNFRSF9	0,80	3,32*	0,56*	3,30*	0,58*	3,37*	0,92	3,32*	0,58	3,23*
TNFRSF14	1,61*	2,29*	1,53*	2,23*	1,55*	2,25*	1,65*	2,46*	1,44*	2,28*
TNFSF18	2,11*	1,63*	2,11*	1,58*	2,12*	1,65*	2,20*	1,79*	2,11*	1,66*
TNFAIP6	0,74	1,61*	0,63	1,55*	0,64	1,69*	0,80	1,66*	0,69	1,62*
TNFRSF13C	0,80	1,59*	0,54	1,57*	0,55*	1,81*	0,82	1,86*	0,59	1,56*
TNFRSF10B	1,00	1,54*	0,82	1,53*	1,04	1,63*	1,18	1,54*	0,85	1,53*

Примечание. Здесь и на рис. 1–4 представлены значения отношения $\ln A / \ln K$, где $\ln A$ – натуральный логарифм нормализованного значения сигнала в опытной пробе А (инкубация с ГМДП-А); $\ln K$ – то же, но для контрольной пробы К (инкубация клеток в отсутствие ГМДП-А). * – $p < 0,05$ – достоверность различий в опытной пробе (А) по сравнению с контрольной пробой (К).

Рис. 1. Экспрессия генов *CRKL* и *CRK* в НК-клетках под действием ГМДП-А в течение 6 и 16 ч

должительным и наблюдался только в первые 6 ч воздействия препарата (рис. 2).

Обнаружено, что экспрессия гена *ZAP70* под действием ГМДП-А не изменялась через 6 ч и значительно, на 50 %, увеличивалась через 16 ч. Экспрессия генов *RAPGEF1* и *RAP2A* в НК-клетках под действием ГМДП-А существенно не изменяется; только экспрессия гена *RAP1A* достоверно увеличивалась во всех образцах НК-клетках через 16 ч. ГМДП-А в значительной степени влияет и на экспрессию генов семейства *VAV*, продукты которых являются сигнальными медиаторами для семейства малых ГТФ-связывающих белков Rho/Rac, опосредующих обмен гуаниновых нуклеотидов. Экспрессия гена *VAV1* достоверно уменьшалась через 6 ч во всех образцах НК-клеток в 2–2,5 раза, и это уменьшение сохранялось в течение всего 16-часового периода наблюдения. В противоположность этому под воздействием ГМДП-А экспрессия генов *VAV2* и *VAV3* увеличивалась практически во всех образцах НК-клеток, но только через 16 ч. ГМДП-А через 16 ч достоверно увеличивал экспрессию гена *PLCB1* более чем 2 раза во всех образцах культивируемых НК-клеток (см. табл. 2).

Полученные результаты указывают на выраженную ГМДП-А-индуцированную экспрессию генов *PIK3R1* и *PIK3R3*, кодирующих изоформы регуляторных субъединиц фосфоинозитид-3-киназы PI3K класса I в НК-клетках, и в особенности *PIK3R3*, транскрипция которой была усилена под воздействием препарата более чем в 2 раза. Транскрипция другой субъединицы – *PIK3C2G*, относящейся к ферментам PI3K класса II, характеризовалась лишь слегка повышенным уровнем в некоторых культурах НК-клеток, стимулированных ГМДП-А. Через 16 ч воздействия ГМДП-А в НК-клетках наблюдалось увеличение на 77–110 % экспрессии гена *FCGR3A*, кодирующего низкоаффинный рецептор Fc-фрагмента IgG (CD16a).

При исследовании экспрессии генов *PLCG1* и *PLCG2* в НК-клетках человека обнаружено, что, в отличие от гена *PLCB1*, экспрессия гена *PLCG2* под воздействием

Рис. 2. Экспрессия генов *SYK* и *ZAP70* в НК-клетках под действием ГМДП-А в течение 6 и 16 ч

ГМДП-А во всех пяти образцах НК-клеток более чем двукратно уменьшалась через 6 ч и в еще более значительной степени – через 16 ч ($p < 0,05$). Выявленные изменения транскрипционной активности аналогичного по функции гена *PLCG1* практически отсутствовали ($p > 0,05$) (рис. 3).

ГМДП-А стимулировал экспрессию генов ИФН I-го типа и их рецептора, причем содержание транскриптов генов *IFNA1* и *IFNA6* повышалось в значительной степени уже через 6 ч, а через 16 ч их экспрессия увеличивалась более чем вдвое. При этом уровень экспрессии гена *IFNA21* через 6 ч понижался почти в 2 раза и троекратно возрастал по отношению к первоначальному падению к 16 ч инкубации с препаратом. Повышенная экспрессия гена рецептора ИФН- α – *IFNAR1* – наблюдалась уже в первые 6 ч и еще через 10 ч экспрессия гена продолжала увеличиваться. Под воздействием ГМДП-А в течение 16 ч экспрессия генов *STAT*, продукты которых участвуют в передаче сигналов

Рис. 3. Экспрессия генов фосфатидилинозитол-специфической фосфолипазы $C\gamma$ -1 (*PLCG1*) и фосфатидилинозитол-специфической фосфолипазы $C\gamma$ -2 (*PLCG2*) в НК-клетках под действием ГМДП-А в течение 6 и 16 ч

Рис. 4. Экспрессия генов *MAP2K7* и *MAP3K6* в НК-клетках под действием ГМДП-А в течение 6 и 16 ч

и активации транскрипции, стабильно увеличивалась во всех образцах. Наблюдалось более чем двукратное усиление экспрессии гена *TNFSF18* уже через 6 ч инкубации НК-клеток с ГМДП-А, полуторакратное увеличение экспрессии генов *TNFAIP6*, *TNFRSF13C*, *TNFRSF10B* и двукратное увеличение экспрессии генов *TNFRSF9*, *TNFRSF14*, *TNFSF18* в НК-клетках через 16 ч (см. табл. 2).

Активация экспрессии генов, кодирующих белки MAPK-пути, наблюдалась в отношении всех изученных участников сигнального пути MAPK уже через 6 ч воздействия ГМДП-А. Экспрессия двух из них – *MAP3K6* и *MAP2K7* – возрастала более чем вдвое через 16 ч после добавления препарата в культуру клеток (рис. 4).

Обсуждение

Как видно из табл. 2, ГМДП-А воздействует на различные этапы фосфорилирования MAPK, гидролиз фосфолипидов, экспрессию адаптерных белков и рецепторов, ответственных за связывание с иммуноглобулинами и цитокинами. Известно, что сигнальные адаптеры CrkL и Crk, интегрируя внешние и внутренние клеточные сигналы, координируют динамическую активацию клеточных сигнальных путей, обеспечивающих регуляцию альтернативного сплайсинга молекул РНК – процесса, критически значимого для онкогенеза. Crk, начиная с эмбриогенеза, регулирует различные внутриклеточные события, которые требуют организованной динамики цитоскелета. Его постоянное наличие является важным условием для поддержания нормального функционирования клетки. Нокдаун как *CRK*, так и *CRKL* в фибробластах приводил к уменьшению площади клеточной поверхности и образованию округлого клеточного фенотипа. Эти морфологические изменения сопровождалось уменьшением участков адгезии, снижением количества примембранных актиновых микрофиламентов и разрушением микротрубочек. Кроме того, снижалась спонтанная подвижность клеток, в том числе – в тесте заживления «раневого» повреждения

in vitro. Дальнейшие исследования сигнальной трансдукции в цитотоксическом иммунологическом синапсе НК-клеток показали, что нокдаун гена *CRKL* значительно уменьшал конъюгацию, дегрануляцию и цитотоксичность НК-клеток, накопление как F-актина, так и фосфорилированного Vav-1 в цитотоксическом иммунологическом синапсе. При этом нарушалась поляризация центра организации микротрубочек у рецептора NKG2D, необходимого для проявления цитотоксичности НК-клеток. Кроме того, нокдаун *CRKL* приводил к снижению накопления лигандов CD16 и NKG2D на мембране НК-клеток [25]. В других экспериментах была продемонстрирована существенная роль белков Crk и CrkL в контроле активации и ингибирования НК-клеток, в том числе в активации рецептора CD16 и фосфорилированного Vav-1 [26]. Поэтому представляло интерес исследовать эффект ГМДП-А на экспрессию *CRKL* в НК-клетках человека. Обнаруженное в данном исследовании значительное увеличение экспрессии гена *CRKL* под действием ГМДП-А может лежать в основе возрастания цитотоксичности НК-клеток под влиянием препарата, обнаруженной ранее [27].

Известно, что Syk опосредует разнообразные биологические функции, включая клеточную адгезию, ангиогенез. Syk активируется лектинами С-типа и интегринами и запускает CARD9/CARMA1-BCL10-MALT1-путь и NLRP3-зависимое воспаление. Syk играет существенную роль в аллергических и аутоиммунных заболеваниях, а также в развитии гематологических злокачественных новообразований, таких как В-клеточные лимфомы. Новый ингибитор Syk оказывал выраженные клинически благоприятные эффекты при ревматоидном артрите человека, В-клеточных лимфомах, тромбоцитопении [28].

В отличие от эволюционно более древней Syk-киназы, представленной у дрозофилы и во всех гемопоэтических клетках млекопитающих, Zap-70 преимущественно экспрессируется в НК-клетках и Т-лимфоцитах. Нокдаун генов *SYK* и *ZAP70* предотвращает реакции FcγR-опосредованной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности [29]. Данные табл. 2 указывают на то, что в отличие от ингибирующего эффекта на экспрессию гена *SYK*, ГМДП-А через 16 ч на 50 % увеличивал уровень экспрессии гена *ZAP70*. Возможно, что именно Zap-70-зависимые процессы необходимы для активации препаратом ГМДП-А цитотоксического механизма НК-клеток, тогда как снижение уровня Syk-киназы под действием ГМДП-А может иметь значение для запуска других сигнальных путей, что объясняет положительный эффект ГМДП-А в модели септического шока [30], а также клинический эффект ГМДП, прототипа ГМДП-А при лечении аллергических заболеваний [31], псориаза [32], тромбо- и цитопений [33].

Компоненты сигнального пути RAP1 – низкомолекулярные ГТФазы семейства RAS. Белки RAP контролируют формирование иммунологического синапса в иммунокомпетентных клетках, их миграцию и адгезию к клеткам-мишеням, играя значительную роль

в поддержании функциональной активности НК-клеток. Интересно, что в НК-клетках человека именно продукт гена *RAP1A* опосредует NKG2D-стимулированную активацию CrkL-регулируемого цитотоксического механизма, опосредованного адгезией НК-клеток, поляризацией цитотоксических гранул и их экзоцитозом [34]. Поэтому обнаруженные в нашем исследовании стимулирующие эффекты ГМДП-А на экспрессию обоих генов – *CRKL* и *RAP1A* – указывают на общность сигнальных механизмов, инициируемых ГМДП-А и запускаемых в естественных условиях через активацию рецептора NKG2D.

Усиление активности НК-клеток человека опосредуется сигнальными механизмами, в которых участвуют и Vav-1, и Vav-2. Однако воздействие ГМДП-А приводило к усилению экспрессии только гена *VAV2*, что, возможно, может отличать сигнальные механизмы, запускаемые ГМДП-А и NKG2D: в последнем случае вовлечение именно сигнального медиатора Vav-1 с участием трансмембранного адаптора DAP-10 является основным механизмом, приводящим к запуску эффекторных элементов цитотоксичности НК-клеток.

Ген *PLCB1* кодирует фосфолипазу Cb(PLCB)-1, которая катализирует образование инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерина из фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата. Ген *PLCB1* играет решающую роль в запуске программы, ответственной за дифференцировку миобластов и остеогенез у мыши. Продукт гена *PLCB1* – изоформа PI-PLCB1 – определяет внутриядерный фосфоинозитидный цикл, при котором активация ядерного PI-PLC приводит к генерации диацилглицерина внутри ядра. Метаболизм фосфоинозиотида в ядре, открытый еще в 1987 г. Л. Соссо [35], связан с контролем пролиферации и дифференцировки различных клеток, в том числе НК-клеток. Было показано, что, несмотря на существование двух других изоформ PLCb, только PLCB1 характеризовалась исключительной локализацией в ядре, где она контролирует фосфотидилинозитид-связанные сигнальные процессы в НК-клетках, стимулированных ИЛ-2. При этом активацию PI-PLCB1 в ядре путем фосфорилирования осуществляла транслонцированная в ядро MAP-киназа, распознающая последовательности аминокислот 980–983 (Pro-Ser-Ser-Pro) в структуре PLCB1. Интересно, что подобная активация PI-PLCB1 и обусловленные ею фосфоинозитид-связанные процессы в ядре, приводящие к выраженной цитотоксической активности клеток, были обнаружены и при генерации цитотоксических НК-клеток с помощью других провоспалительных цитокинов – ИЛ-12 и ИЛ-15 [36]. Следует полагать, что ГМДП-А, вызвавший усиление экспрессии гена *PLCB1*, имитирует сигнальные процессы, общие для ключевых цитокинов иммунной системы – ИЛ-2, ИЛ-12 и ИЛ-15 и приводящие к тому же результату – усилению цитотоксической активности НК-клеток.

Рецептор FcRIIIa/CD16a участвует в опосредованных НК-клетками реакциях АЗКЦ. Достоверное увеличение экспрессии гена *FCGR3A* объясняет способ-

ность ГМДП-А повышать цитотоксическую активность НК-клеток.

Другой фосфатидилинозитол-специфический фермент – фосфолипаза Cγ (PLCG), катализирующий гидролиз фосфолипидов, также контролирует процессы пролиферации и миграции клеток. Ферменты PLCG1 и PLCG2 локализуются в цитоплазме клеток и являются частью сигнального комплекса, передающего активирующие сигналы в пределах цитоплазмы НК-клеток. Фосфорилированные молекулы PLCG1 и PLCG2 инициируют запуск катионами Ca²⁺ дегрануляции цитотоксических клеток [37].

Данные, полученные по уровню экспрессии генов *PLCG1* и *PLCG2*, свидетельствуют в пользу того, что ГМДП-А противоположным образом модулирует экспрессию генов, кодирующих фосфолипазы Cb и Cγ. Возможно, такая высокодифференцированная лекарственно индуцированная модуляция генной экспрессии и определяет специфику индукции ГМДП-А различных сигнальных механизмов, контролирующих цитотоксические реакции НК-клеток.

ГМДП-А стимулирует экспрессию генов ИФН 1-го типа и их рецептора. Ранее было показано, что ИФН-α необходим для проявления активности НК-клеток [38]. Более того, наличие ИФН-α в микроокружении опухоли оказалось необходимым для терапевтической антиметастатической активности НК-клеток у мышей [39]. Можно полагать, что вызванное ГМДП-А увеличение экспрессии генов ИФН 1-го типа и его рецептора, выявленное в нашей работе, усиливает функциональную активность НК-клеток.

Транскрипция генов *STAT* имеет непосредственное отношение к усилению продукции медиаторов иммунитета, созреванию и выживанию НК-клеток. Так, *STAT6* определяет продукцию Th2-цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13 с противовоспалительной активностью, *STAT5A* контролирует процессы созревания НК-клеток и противодействует их гибели, а *STAT2* входит в тримерный комплекс *ISGF3*, способствующий выживанию НК-клеток при вирусной инфекции. Таким образом, ГМДП-А способен усиливать потенциалы выживаемости и противовоспалительной активности НК-клеток человека, что особенно важно при длительном воздействии цитоплазматического стресса и окислительного стресса, которым подвергаются НК-клетки, особенно в период развития таких патологических процессов в организме, как рак, бактериальные, вирусные и паразитарные инфекции, хронические критические состояния.

MAP2K7 и MAP2K4 являются единственными известными киназами, которые непосредственно активируют стресс-активируемые протеинкиназы c-Jun (N-концевые киназы MAPK8/JNK1, MAPK9/JNK2 и MAPK10/JNK3). Киназа MAP2K7 специфически активирует JNK, которые, в свою очередь, активируют субстраты, в том числе факторы транскрипции или проапоптотические белки. MAP2K7 необходим для активации JNK, осуществляемой двойным фосфорилирова-

нием JNK по Thr183 и Tyr185 (P-JNK). Обнаруженное стойкое увеличение экспрессии изученных генов сигнального пути MAPK при воздействии ГМДП-А свидетельствует о том, что препарат способен поддерживать MAPK-зависимый сигнальный путь, необходимый для генерации НК-клеток, включая поляризацию цитотоксических гранул, для проявления функциональной активности НК-клеток [40].

Секретируемые и мембраноассоциированные белки, принадлежащие к семействам ФНО и их рецепторам, участвуют в активации клеток врожденного иммунитета, в том числе НК-клеток. Интересно, что повышенная экспрессия генов *TNFRSF9* и *TNFRSF14* была отмечена в НК-клетках пациентов, перенесших трансплантацию почки, после активации низкоаффинных Fc-рецепторов (CD16a) донор-специфическими анти-HLA-антителами [41]. Обнаруженное в нашем исследовании усиление экспрессии этих генов указывает на общность сигнальных путей, инициированных антителами через CD16, и процессов, запускаемых ГМДП-А.

Полученные результаты по изучению эффекта ГМДП-А на транскриптом НК-клеток человека свидетельствуют о способности иммуномодулирующего препарата значительно изменять экспрессию многих генов, контролирующих сигнальные пути активации НК-клеток. Совокупность экспериментальных данных позволяет заключить, что ГМДП-А может быть эффективным средством противодействия ранним этапам

онкогенной и вирусной трансформации для пациентов с дефектами клеточного звена иммунитета.

Выводы

1. Инкубация выделенных НК-клеток человека с ГМДП-А *in vitro* приводит к 1,5–2,5-кратному увеличению уровня транскриптов следующих генов, ассоциированных с процессами трансдукции сигналов от рецепторов НК-клеток (в скобках указаны контролируемые генами параметры функционирования клеток):

1) *STAT5A*, *STAT2* (связаны с выживанием НК-клеток);

2) *PLCB1*, *PIK3R1* и *PIK3R3* (связаны с метаболизмом фосфолипидов);

3) *STAT6* (связаны с продукцией противовоспалительных цитокинов);

4) *CRKL*, *VAV-2*, *ZAP70*, *RAP1A*, *PLCB1*, *FCGR3A*, семейство *MAPK*, *IFNA1*, *TNFRSF9*, *TNFSF14* (связаны с цитотоксическими реакциями НК-клеток).

2. Изменения экспрессии генов *PLCB1* и *CRKL/RAP1A*, индуцированные ГМДП-А в НК-клетках, имитируют эффекты, наблюдаемые при активации НК-клеток цитокинами ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-15 или лигандами рецептора NKG2D, соответственно.

3. Профиль сигнальных путей, определяемый по изменению транскриптома НК-клеток под воздействием ГМДП-А, помогает объяснить обнаруженный ранее противоопухолевый эффект препарата [42].

Литература

1. Гурьянова С.В., Хаитов Р.М. Глюкозаминилмурамилдипептид – ГМДП: воздействие на мукозальный иммунитет (к вопросу иммунотерапии и иммунопрофилактики). Иммунология. 2020; 41 (2): 174–83.
2. Abramashvili Yu.G., Kolesnikova N.V., Borisova O.Yu., Guryanova S.V. Low molecular weight bioregulator of bacterial origin in condylomatosis therapy optimization. RUDN Journal of Medicine. 2020; 24 (2): 163–7. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-2-163-167.
3. Гурьянова С.В., Борисова О.Ю., Колесникова Н.В., Лежава Н.Л., Козлов И.Г., Гудима Г.О. Влияние мурамилпептида на микробный состав микрофлоры ротовой полости. Иммунология. 2019; 40 (6): 34–40. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-16005.
4. Мещерякова Е.А., Гурьянова С.В., Макаров Е.А., Андронов Т.М., Иванов В.Т. Структурно-функциональное исследование глюкозаминилмурамилпептидов. Влияние химической модификации N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамилдипептида на его иммуномодулирующие свойства *in vivo* и *in vitro*. Биоорганическая химия. 1991; 17: 1157–65.
5. Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D. et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. Annu. Rev. 2001; 19: 197–223.
6. Pesce S., Greppi M., Grossi F., Del Zotto G. et al. PD-1/PD-Ls checkpoint: insight on the potential role of NK cells. Front. Immunol. 2019; 10: 1242.
7. Vitale M., Della Chiesa M., Carlomagno S., Romagnani C. et al. The small subset of CD56brightCD16-natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells. Eur. J. Immunol. 2004; 34 (6): 1715–22.
8. Dotiwala F., Lieberman J. Granulysin: killer lymphocyte safeguard against microbes. Curr. Opin. Immunol. 2019; 60: 19–29.
9. Zheng P., Hanson C., Liu D. Adaptor protein Crk-like (CrkL) controls natural killer cell function via regulating the accumulation of activating receptors and phosphorylated Vav-1 molecules at immunological synapses (INM2P.433). J. Immunol. 2014; 192 (1 Suppl.): 56.16.
10. Pugh J.L., Nemat-Gorgani N., Norman P.J., Guethlein L.A. et al. Human natural killer cells downregulate Zap70 and syk in response to prolonged activation or DNA damage. J. Immunol. 2018; 200 (3): 1146–58. DOI: 10.4049/jimmunol.1700542.
11. Kotelevets L., Chastre E. Rac1 signaling: from intestinal homeostasis to colorectal cancer metastasis. Cancers (Basel). 2020; 12 (3). pii: E665. DOI: 10.3390/cancers12030665.
12. Minato N. Rap G protein signal in normal and disordered lymphohematopoiesis. Exp. Cell. Res. 2013; 319 (15): 2323–8. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.04.009.
13. Pearce A.C., Senis Y.A., Billadeau D.D., Turner M. et al. Vav1 and vav3 have critical but redundant roles in mediating platelet activation by collagen. J. Biol. Chem. 2004; 279 (52): 53 955–62.
14. Kerr W.G., Colucci F. Inositol phospholipid signaling and the biology of natural killer cells. J. Innate Immun. 2011; 3: 249–57.
15. Gulluni F., De Santis M.C., Margaria J.P., Martini M. et al. Class II PI3K functions in cell biology and disease. Trends Cell Biol. 2019; 29 (4): 339–59. DOI: 10.1016/j.tcb.2019.01.001.
16. Moon W.Y., Powis S.J. Does natural killer cell deficiency (NKD) increase the risk of cancer? NKD may increase the risk of some virus induced cancer. Front. Immunol. 2019; 10: 1703. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01703.
17. Lee Y.H., Choi S.J., Ji J.D., Song G.G. Associations between functional FCGR2A R131H and FCGR3A F158V polymorphisms and responsiveness to TNF blockers in spondyloarthritis, psoriasis and Crohn's disease: a meta-analysis. Pharmacogenomics. 2016; 13: 1465–77. DOI: 10.2217/pgs.16.27.
18. Osterlund P.I., Pietilä T.E., Veckman V., Kotenko S.V. et al. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-λ) genes. J. Immunol. 2007; 179 (6): 3434–42. DOI: 10.4049/jimmunol.179.6.3434.
19. Rogovskii V.S. The linkage between inflammation and immune tolerance: interfering with inflammation in cancer. Curr. Cancer

Drug Targets. 2017; 17 (4): 325–32. DOI: 10.2174/1568009617666170109110816.

20. Orton R.J., Sturm O.E., Vyshemirsky V., Calder M. et al. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem. J.* 2005; 392 (2): 249–61. DOI: 10.1042/BJ20050908.

21. Wallach D. The TNF cytokine family: one track in a road paved by many. *Cytokine.* 2013; 63 (3): 225–9. DOI: 10.1016/j.cyt.2013.05.027.

22. Jewett A., Kos J., Fong Y., Ko M.W. et al. NK cells shape pancreatic and oral tumor microenvironments; role in inhibition of tumor growth and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 2018; 53: 178–88. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.08.001.

23. Rostovtseva L.I., Andronova T.M., Malkova V.P., Sorokina I.B., Ivanov V.T. Synthesis and antitumor activity of glycopeptides containing N-acetylglucosaminyl-(1→4)-N-acetylmuramyl disaccharide unit. *Bioorg. Khim.* 1981; 7: 1843–58.

24. Курсаков С.В., Кузнецова Е.Г., Курылева О.М., Саломатина Л.А., Гурьянова С.В., Борисова О.Ю., Гудима Г.О., Севастьянов В.И. Разработка и валидация методики определения глюкозаминилмурамилдипептида в водных растворах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Иммунология.* 2020; 41 (1): 74–82. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-74-82.

25. Liu D. The adaptor protein Crk in immune response. *Immunol. Cell Biol.* 2014; 92: 80–9.

26. Liu D., Peterson M.E., Long E.O. The adaptor protein Crk controls activation and inhibition of natural killer cells. *Immunity.* 2012; 36: 600–11.

27. Гапонов А.М., Якушенко Е.В., Тутельян А.В., Писарев В.М., Александров И.А., Андронova Т.М., Козлов И.Г. Производное мурамилдипептида (ГМДП-А) стимулирует цитотоксичность, экспрессию генов перфорина и рецептора ИЛ-18 НК-клеток. *Иммунология.* 2019; 40 (5): 44–51.

28. Connell N.T., Berliner N. Fostamatinib for the treatment of chronic immune thrombocytopenia. *Blood.* 2019; 133 (19): 2027–30. DOI: 10.1182/blood-2018-11-852491.

29. Colucci F., Schweighoffer E., Tomasello E., Turner M. et al. Natural cytotoxicity uncoupled from the Syk and ZAP-70 intracellular kinases. *Nat. Immunol.* 2002; 3: 288–94.

30. Meshcheryakova E., Guryanova S., Makarov E., Alekseeva L. et al. Prevention of experimental septic shock by pretreatment of mice with muramyl peptides. *Int. Immunopharmacol.* 2001; 1 (9–10): 1857–65.

31. Колесникова Н.В., Козлов И.Г., Гурьянова С.В., Ковков Е.А., Андронova Т.М. Клинико-иммунологическая эффективность и перспективы использования мурамилдипептидов в лече-

нии atopических заболеваний. *Медицинская иммунология.* 2016; 18 (1): 15–20.

32. Guryanova S., Udzhukhu V., Kubylnsky A. Pathogenetic therapy of psoriasis by muramyl peptide. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1275. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01275.

33. Манапова Э.Р., Фазылов В.Х., Гурьянова С.В. Цитопении и их коррекция при противовирусной терапии хронического гепатита С у пациентов с генотипом 1. *Вопросы вирусологии.* 2017; 629 (4): 174–8.

34. Segovis C.M., Schoon R.A., Dick C.J., Nacusi L.P., Leibson P.J., Billadeau D.D. PI3K links NKG2D signaling to a CrkL pathway involved in natural killer cell adhesion, polarity, and granule secretion. *J. Immunol.* 2009; 182 (11): 6933–42. DOI: 10.4049/jimmunol.0803840.

35. Cocco L., Gilmour R.S., Ognibene A., Manzoli F.A., Irvine R.F. Synthesis of polyphosphoinositides in nuclei of Friend cells. Evidence for phosphoinositide metabolism inside the nucleus which changes with cell differentiation. *Biochem. J.* 1987; 248: 765–70.

36. Ponti C., Falconi M., Billi A.M., Faenza I. et al. IL-12 and IL-15 induce activation of nuclear PLCβeta in human natural killer cells. *Int. J. Oncol.* 2002; 20 (1): 149–53.

37. Matalon O., Fried S., Ben-Shmuel A., Pauker M.H., Joseph N., Keizer D. et al. Dephosphorylation of the adaptor LAT and phospholipase C-γ by SHP-1 inhibits natural killer cell cytotoxicity. *Sci. Signal.* 2016; 9: ra54.

38. Comet N.R., Aguiló J.I., Rathoré M.G., Catalán E. et al. IFNα signaling through PKC-θ is essential for antitumor NK cell function. *Oncoimmunology.* 2014; 3 (8): e948705. DOI: 10.4161/21624011.2014.948705.

39. Takehara T., Uemura A., Tatsumi T., Suzuki T., Kimura R., Shiotani A., Ohkawa K., Kanto T., Hiramatsu N., Hayashi N. Natural killer cell-mediated ablation of metastatic liver tumors by hydrodynamic injection of IFNα gene to mice. *Int. J. Cancer.* 2007; 120 (6): 1252–60. DOI: 10.1002/ijc.22152.

40. Li C., Ge B., Nicotra M., Stern J.N.H. et al. JNK MAP kinase activation is required for MTOC and granule polarization in NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008; 105 (8): 3017–22. DOI: 10.1073/pnas.0712310105.

41. Parkes M.D., Halloran P.F., Hidalgo L.G. Evidence for CD16a-mediated NK cell stimulation in antibody-mediated kidney transplant rejection. *Transplantation.* 2017; 101 (4): e102–11. DOI: 10.1097/TP.0000000000001586.

42. Гапонов А.М., Якушенко Е.В., Тутельян А.В., Козлов И.Г. Влияние производного мурамилдипептида (ГМДП-А) на линии опухолевых клеток, экспрессирующих NOD-2. *Российский иммунологический журнал.* 2018; 12 (21): 128–40.

■ References

1. Guryanova S.V., Khaitov R.M. Glucosaminylmuramyl dipeptide – GMDP: mucosal immunotherapy and immunoprophylaxis. *Immunologiya.* 2020; 41 (2): 174–83. (in Russian)

2. Abramashvili Yu.G., Kolesnikova N.V., Borisova O.Yu., Guryanova S.V. Low molecular weight bioregulator of bacterial origin in condylomatosis therapy optimization. *RUDN Journal of Medicine.* 2020; 24 (2): 163–7. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-2-163-167.

3. Guryanova S.V., Borisova O.Yu., Kolesnikova N.V., Lezhava N.L., Kozlov I.G., Gudima G.O. Effect of muramyl peptide on the microbial landscape of the oral cavity. *Immunologiya.* 2019; 40 (6): 34–40. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-16005. (in Russian)

4. Meshcheryakova E.A., Guryanova S.V., Makarov E.A., Andronova T.M., Ivanov V.T. Structure-function investigation of glucosamuramyl peptides. Influence of chemical modification of N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl dipeptide (GMDP) on its immunomodulatory properties *in vivo* and *in vitro*. *Bioorganicheskaya khimiya.* 1991; 17 (9): 1157–65.

5. Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D., et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev.* 2001; 19: 197–223.

6. Pesce S., Greppi M., Grossi F., Del Zotto G., et al. PD-1/PD-Ls checkpoint: insight on the potential role of NK cells. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1242.

7. Vitale M., Della Chiesa M., Carlomagno S., Romagnani C., et al. The small subset of CD56brightCD16-natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-γ

production upon interaction with dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34 (6): 1715–22.

8. Dotiwala F., Lieberman J. Granulysin: killer lymphocyte safeguard against microbes. *Curr. Opin. Immunol.* 2019; 60: 19–29.

9. Zheng P., Hanson C., Liu D. Adaptor protein Crk-like (CrkL) controls natural killer cell function via regulating the accumulation of activating receptors and phosphorylated Vav-1 molecules at immunological synapses (INM2P.433). *J. Immunol.* 2014; 192 (1 Suppl): 56.16.

10. Pugh J.L., Nemat-Gorgani N., Norman P.J., Guethlein L.A., et al. Human natural killer cells downregulate Zap70 and syk in response to prolonged activation or DNA damage. *J. Immunol.* 2018; 200 (3): 1146–58. DOI: 10.4049/jimmunol.1700542.

11. Kotelevets L., Chastre E. Rac1 signaling: from intestinal homeostasis to colorectal cancer metastasis. *Cancers (Basel).* 2020; 12 (3): pii: E665. DOI: 10.3390/cancers12030665.

12. Minato N. Rap G protein signal in normal and disordered lymphohematopoiesis. *Exp. Cell. Res.* 2013; 319 (15): 2323–8. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.04.009.

13. Pearce A.C., Senis Y.A., Billadeau D.D., Turner M., et al. Vav1 and vav3 have critical but redundant roles in mediating platelet activation by collagen. *J. Biol. Chem.* 2004; 279 (52): 53 955–62.

14. Kerr W.G., Colucci F. Inositol phospholipid signaling and the biology of natural killer cells. *J. Innate Immun.* 2011; 3: 249–57.

15. Gulluni F., De Santis M.C., Margaria J.P., Martini M., et al. Class II PI3K functions in cell biology and disease. *Trends Cell Biol.* 2019; 29 (4): 339–59. DOI: 10.1016/j.tcb.2019.01.001.

16. Moon W.Y., Powis S.J. Does natural killer cell deficiency (NKD) increase the risk of cancer? NKD may increase the risk of some virus induced cancer. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1703. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01703.
17. Lee Y.H., Choi S.J., Ji J.D., Song G.G. Associations between functional FCGR2A R131H and FCGR3A F158V polymorphisms and responsiveness to TNF blockers in spondyloarthritis, psoriasis and Crohn's disease: a meta-analysis. *Pharmacogenomics.* 2016; 13: 1465–77. DOI: 10.2217/pgs.16.27.
18. Osterlund P.I., Pietilä T.E., Veckman V., Kotenko S.V., et al. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN- λ) genes. *J. Immunol.* 2007; 179 (6): 3434–42. DOI: 10.4049/jimmunol.179.6.3434.
19. Rogovskii V.S. The linkage between inflammation and immune tolerance: interfering with inflammation in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2017; 17 (4): 325–32. DOI: 10.2174/1568009617666170109110816.
20. Orton R.J., Sturm O.E., Vyshemirsky V., Calder M., et al. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem. J.* 2005; 392 (2): 249–61. DOI: 10.1042/BJ20050908.
21. Wallach D. The TNF cytokine family: one track in a road paved by many. *Cytokine.* 2013; 63 (3): 225–9. DOI: 10.1016/j.cyt.2013.05.027.
22. Jewett A., Kos J., Fong Y., Ko M.W., et al. NK cells shape pancreatic and oral tumor microenvironments; role in inhibition of tumor growth and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 2018; 53: 178–88. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.08.001.
23. Rostovtseva L.I., Andronova T.M., Malkova V.P., Sorokina I.B., Ivanov V.T. Synthesis and antitumor activity of glycopeptides containing N-acetylglucosaminyl-(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetylmuramyl disaccharide unit. *Bioorganicheskaya khimiya.* 1981; 7: 1843–58.
24. Kursakov S.V., Kuznetsova E.G., Kuryleva O.M., Salomatina L.A., Guryanova S.V., Borisova O.Yu., Gudima G.O., Sevastyanov V.I. Development and validation of a method for glucosaminyl muramyl dipeptide determining in aqueous solutions by high performance liquid chromatography. *Immunologiya.* 2020; 41 (1): 74–82. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-74-82. (in Russian)
25. Liu D. The adaptor protein Crk in immune response. *Immunol. Cell Biol.* 2014; 92: 80–9.
26. Liu D., Peterson M.E., Long E.O. The adaptor protein Crk controls activation and inhibition of natural killer cells. *Immunity.* 2012; 36: 600–11.
27. Gaponov A.M., Yakushenko E.V., Tutelyan A.V., Pisarev V.M., et al. Muramyl dipeptide derivative (GMDP-A) stimulates NK-cell cytotoxicity, expression of perforin and receptor IL-18. *Immunologiya.* 2019; 40 (5): 44–51. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15005. (in Russian)
28. Connell N.T., Berliner N. Fostamatinib for the treatment of chronic immune thrombocytopenia. *Blood.* 2019; 133 (19): 2027–30. DOI: 10.1182/blood-2018-11-852491.
29. Colucci F., Schweighoffer E., Tomasello E., Turner M., et al. Natural cytotoxicity uncoupled from the Syk and ZAP-70 intracellular kinases. *Nat. Immunol.* 2002; 3: 288–94.
30. Meshcheryakova E., Guryanova S., Makarov E., Alekseeva L., et al. Prevention of experimental septic shock by pretreatment of mice with muramyl peptides. *Int. Immunopharmacol.* 2001; 1 (9–10): 1857–65.
31. Kolesnikova N.V., Kozlov I.G., Guryanova S.V., Kokov E.A., Andronova T.M. Clinical and immunological efficiency of muramyl dipeptide in the treatment of atopic diseases. *Meditinskaya immunologiya.* 2016; 18 (1): 15–20. DOI: 10.15789/1563-0625-2016-1-15-20 (in Russian)
32. Guryanova S., Udzhukhu V., Kubylnsky A. Pathogenetic therapy of psoriasis by muramyl peptide. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1275. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01275.
33. Manapova E.R., Fazylov V.Ch., Guryanova S.V. Cytopenias and their correction during antiviral therapy of chronic hepatitis C in patients with genotype 1. *Voprosy virusologii.* 2017; 62 (4): 174–8. (in Russian)
34. Segovis C.M., Schoon R.A., Dick C.J., Nacusi L.P., Leibson P.J., Billadeau D.D. PI3K links NKG2D signaling to a CrkL pathway involved in natural killer cell adhesion, polarity, and granule secretion. *J. Immunol.* 2009; 182 (11): 6933–42. DOI: 10.4049/jimmunol.0803840.
35. Cocco L., Gilmour R.S., Ognibene A., Manzoli F.A., Irvine R.F. Synthesis of polyphosphoinositides in nuclei of Friend cells. Evidence for phosphoinositide metabolism inside the nucleus which changes with cell differentiation. *Biochem. J.* 1987; 248: 765–70.
36. Ponti C., Falconi M., Billi A.M., Faenza I., et al. IL-12 and IL-15 induce activation of nuclear PLC β in human natural killer cells. *Int. J. Oncol.* 2002; 20 (1): 149–53.
37. Matalon O., Fried S., Ben-Shmuel A., Pauker M.H., Joseph N., Keizer D., et al. Dephosphorylation of the adaptor LAT and phospholipase C- γ by SHP-1 inhibits natural killer cell cytotoxicity. *Sci. Signal.* 2016; 9: ra54.
38. Comet N.R., Aguiló J.I., Rathoré M.G., Catalán E., et al. IFN α signaling through PKC- θ is essential for antitumor NK cell function. *Oncoimmunology.* 2014; 3 (8): e948705. DOI: 10.4161/21624011.2014.948705.
39. Takehara T., Uemura A., Tatsumi T., Suzuki T., Kimura R., Shiotani A., Ohkawa K., Kanto T., Hiramatsu N., Hayashi N. Natural killer cell-mediated ablation of metastatic liver tumors by hydrodynamic injection of IFN α gene to mice. *Int. J. Cancer.* 2007; 120 (6): 1252–60. DOI: 10.1002/ijc.22152.
40. Li C., Ge B., Nicotra M., Stern J.N.H., et al. JNK MAP kinase activation is required for MTOC and granule polarization in NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008; 105 (8): 3017–22. DOI: 10.1073/pnas.0712310105.
41. Parkes M.D., Halloran P.F., Hidalgo L.G. Evidence for CD16a-mediated NK cell stimulation in antibody-mediated kidney transplant rejection. *Transplantation.* 2017; 101 (4): e102–11. DOI: 10.1097/TP.0000000000001586.
42. Gaponov A.M., Yakushenko E.V., Tutelyan A.V., Kozlov I.G. Influence of muramyl dipeptide derivative (GMDP-A) on NOD-2 expressed tumor cell lines. *Rossiyskiy immunsunologicheskii zhurnal.* 2018; 12 (21): 128–40. (in Russian)