

УДК 577.3

СЕНСОРЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, АКТИВИРУЮЩИЕ STING-ЗАВИСИМУЮ ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРФЕРОНОВ В ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ

© 2024 г. Л. В. Смольянинова^{а, *}, О. Н. Солопова^а

^аЛаборатория биоресурсной коллекции клеточных линий и первичных опухолей, НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей, НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115478 Россия

*e-mail: smolyaninova@larisa1@gmail.com

Поступила в редакцию 31.07.2023 г.

Подписана в печать 03.10.2023 г.

Принята к публикации 06.10.2023 г.

В настоящее время белки-сенсоры чужеродной ДНК или РНК, играющие важную роль во врожденном иммунитете, вызывают большой интерес как новый способ иммунотерапии рака. Агонисты этих белков способны активировать в иммунных клетках сигнальные каскады, вызывающие продукцию цитокинов, в частности интерферонов I типа, обладающих мощным цитотоксическим эффектом. В обзоре рассмотрено функционирование цитоплазматических сенсоров нуклеиновых кислот, таких как cGAS, STING, IFI16, AIM2, DAI, DDX41, DNA-PK, MRE-11, TREX1, участвующих в активации продукции различных цитокинов.

Ключевые слова: сенсоры ДНК/РНК, цитокины, интерфероны, cGAS, STING, иммунные клетки

Список сокращений: а.о. — аминокислотные остатки; а.п. — аминокислотная последовательность; дцДНК — двухцепочечная ДНК; мтДНК — митохондриальная ДНК; оцДНК — одноцепочечная ДНК; ЭПР — эндоплазматический ретикулум; AIM2 (absent in melanoma 2) — белок 2, отсутствующий при меланоме; cGAMP — циклический гуанозинмонофосфат-аденозинмонофосфат; cGAS — циклическая гуанозинмонофосфат-аденозинмонофосфат синтаза; CC — двойные спирали; CDN — циклические динуклеотиды; CTT — C-концевой фрагмент; DAI (DNA-dependent activator of IFN regulatory factors) — ДНК-зависимый активатор интерферон-регулируемых факторов; DDX41 (DEAD-box helicase 41) — DEAD-бокс-хеликаза 41; DM — димеризующий мотив; DNA-PK (DNA-dependent serine/threonine protein kinase) — ДНК-зависимая серин/треониновая протеинкиназа; HELIC — хеликазный домен; HIV — вирус иммунодефицита человека; HSV1, HSV2 — вирус простого герпеса 1 и 2 типа; IFI16 (IFN γ -inducible protein 16) — индуцируемый гамма-интерфероном белок 16; IFN — интерферон; IL — интерлейкин; IRF3 (IFN regulatory factor 3) — регуляторный фактор интерферона 3; ISGs — интерферон-стимулируемые гены; LBD — лиганд-связывающий домен; MEFs — мышинные эмбриональные фибробласты; MRE-11 (meiotic recombination 11 homolog A) — гомолог А белка мейотической рекомбинации 11; NBD — нуклеотид-связывающий домен; non-CDN — малые молекулы, не относящиеся к циклическим динуклеотидам; OB — олигонуклеотид/олигосахарид связывающие складки; PAMPs — патоген-ассоциированные молекулярные паттерны; PM — фосфорилируемый мотив; Poly I:C — полиинозиновая-полицитидиловая кислота; PPII — полипролиновый домен; PRRs — рецепторы опознавания паттерна; PYD — пириновый домен; RAD50 (DNA repair protein RAD50) — белок репарации дцДНК; RNAi — РНК-интерференция; SIV — вирус иммунодефицита африканских обезьян; STING (stimulator of interferon genes) — стимулятор генов интерферона; TBK1 (TANK-binding kinase 1) — TANK-связывающая киназа 1; TBM — мотив для связывания протеинкиназы TBK1; TNF — фактор некроза опухолей; TREX1 (three prime repair exonuclease 1) — 3'-концевая репаративная экзонуклеаза 1; VSV — вирус везикулярного стоматита; ZBDs (α и β) — Z-ДНК-связывающие домены; ZBP1 (Z-DNA-binding protein 1) — Z-ДНК связывающий белок 1.

DOI: 10.31857/S0233475524010015, EDN: ztzoe

ВВЕДЕНИЕ

В клетках нашего организма заложены механизмы защиты от присутствия в цитоплазме чужеродной патогенной ДНК или РНК, или собственной ДНК, активирующие системы врожденного иммунитета. Появление в цитоплазме одноцепочечной и двуцепочечной ДНК (оцДНК и дцДНК) и РНК может происходить по ряду причин: инфицирование ДНК вирусами; инфицирование РНК-содержащими ретровирусами, которые активируют собственное воспроизведение посредством ретротранскриптазы; выход бактерий из эндосом; активация сигнального пути регулируемой клеточной смерти, что приводит к разрушению митохондрий и выходу в цитоплазму митохондриальной ДНК (мтДНК); реактивация эндогенных ретровирусных последовательностей; генетические мутации, приводящие к активации нуклеаз; образование микроядер в результате митотических дефектов; повреждение ДНК при лучевой терапии; аккумуляция ДНК в результате фагоцитоза, микропиноцитоза или поглощение ДНК-обогащенных экзосом [1]. Удаление чужеродной ДНК/РНК из клеток требуется для эффективного функционирования клеток и поддержания их нормальной жизнедеятельности. Активация защитных механизмов в присутствии патогенов реализуется с участием рецепторов опознавания паттерна (pattern-recognition receptors, PRRs), к которым относятся мембранные и цитоплазматические белки. У млекопитающих определены несколько классов PRRs, которые направлены на узнавание внеклеточных патогенов (мембранные — Toll-подобные рецепторы (TLRs) и лектиновые рецепторы С-типа (CLRs)) и внутриклеточных патогенов (цитоплазматические — RIG-I-подобные рецепторы (RLRs), Nod-подобные рецепторы (NLRs), AIM2-подобные рецепторы (ALRs)).

При участии PRRs, выступающих в качестве сенсоров не изолированных в ядре нуклеиновых кислот, активируются внутриклеточные сигнальные механизмы для локализации и устранения опасных сигналов. PRRs в ходе эволюции были отобраны по специфичности к бактериальным липополисахаридам, гликопротеинам, содержащим остатки маннозы, пептидам, липотейхоевым кислотам, липопротеинам. Кроме этой специфичности PRRs распознают нуклеиновые кислоты вирусов, бактерий, грибов и нуклеиновые кислоты собственных поврежденных клеток. Нуклеиновые кислоты патогенов включают короткие консервативные молекулярные мотивы, узнаваемые PRRs и называемые патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular

patterns, PAMPs). Отличие патогенной ДНК от собственной ДНК происходит, как предполагается, на основании таких факторов как длина, 3D-структура и последовательность ДНК, внутриклеточная локализация ДНК, статус метилирования ДНК, ассоциация ДНК с гистонами или негистоновыми хроматин-связывающими белками (см. подробные механизмы отличия патогенной от собственной ДНК в обзоре [2]).

Одноцепочечные/двуцепочечные ДНК и РНК патогенов активируют в клетках млекопитающих сигнальные каскады cGAS—STING и RLR—MAVS, изучению которых посвящено много работ в последние десятилетия [3]. Ответом на активацию этих сигнальных путей является продукция клетками провоспалительных цитокинов, следствием чего является воспаление, а также антиген-специфичный адаптивный иммунный ответ. В нашем обзоре мы опишем функционирование цитоплазматических белков-сенсоров нуклеиновых кислот, таких как cGAS, STING, IFI16, AIM2, DAI, DDX41, DNA-PK, MRE-11, TREX1, ассоциированных с сигнальным каскадом cGAS—STING и продукцией провоспалительных цитокинов, в частности интерферонов (IFN) I типа (рис. 1).

Существование разнообразных цитоплазматических белков-сенсоров, активирующих защитные механизмы с участием cGAS—STING сигнального пути, позволяет клеткам эффективно реагировать на проникновение различных патогенов (бактерий, вирусов), а использование агонистов этих сенсоров является в настоящее время одной из стратегий терапии злокачественных новообразований.

Сигнальный путь cGAS—STING включает несколько этапов межбелковых взаимодействий. Первоначально при появлении в клетке оц/дцДНК или РНК фермент циклическая гуанозинмонофосфат-аденозинмонофосфат синтаза (cGAS) взаимодействует с нуклеиновыми кислотами (независимо от типа последовательности), что приводит к каталитической реакции образования вторичного мессенджера — циклического динуклеотида гуанозинмонофосфат-аденозинмонофосфат (cGAMP) из ATP и GTP. Вторичный мессенджер cGAMP является высокоаффинным лигандом белка эндоплазматического ретикулума (ЭПР) STING (stimulator of interferon genes), способен при связывании со STING вызывать его конформационные перестройки, образование гомодимеров и самоактивацию. Активный STING при участии TRAP-транслокон комплекса, а также белков COPII (cytoplasmic coat protein complex-II) и TRAP β (translocon-associated protein β) переходит из ЭПР в аппарат Гольджи [4]. При переходе из

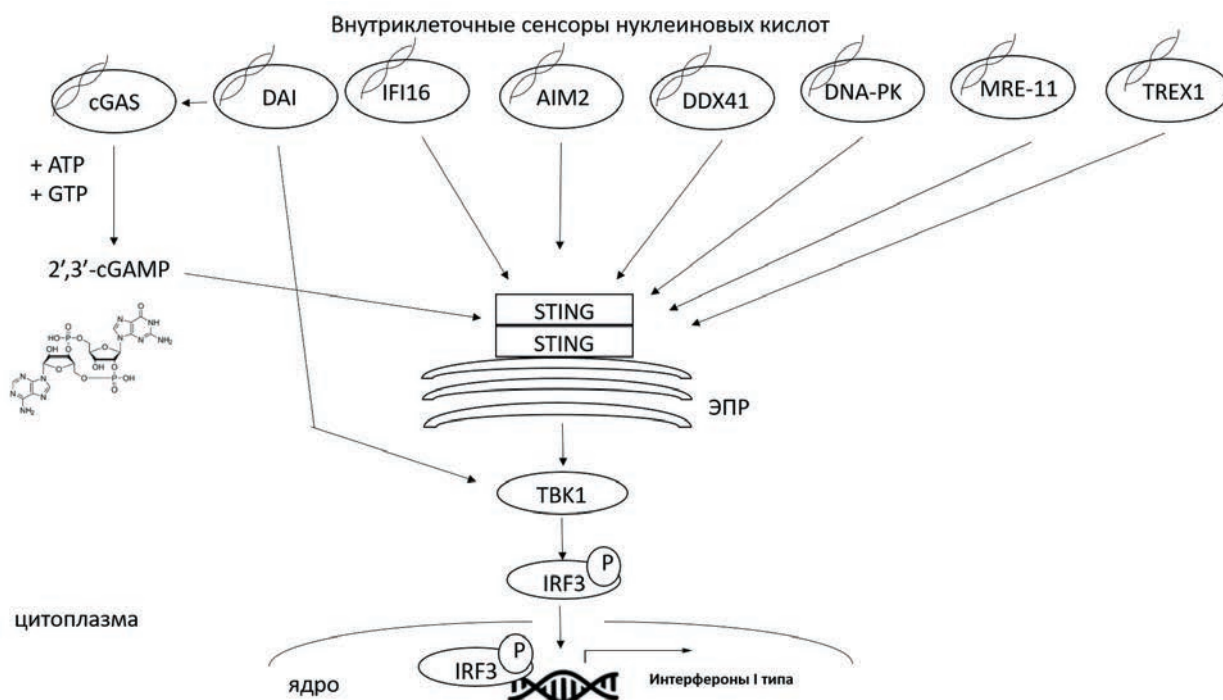


Рис. 1. Цитоплазматические сенсоры нуклеиновых кислот, участвующие в активации STING сигнального пути и вызывающие продукцию интерферонов I типа. cGAS — cyclic GMP-AMP synthase, DAI — DNA-dependent activator of IRFs, IFI16 — IFN γ -inducible protein 16, AIM2 — absent in melanoma 2, DDX41 — DEAD-box helicase 41, DNA-PK — DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit, TREX1 — three prime repair exonuclease 1, STING — stimulator of interferon genes, TBK1 — TANK-binding kinase 1, IRF3 — IFN regulatory factor 3, ЭПР — эндоплазматический ретикулум.

ЭПР в аппарат Гольджи происходит высвобождение С-концевого фрагмента STING, где расположен сайт фосфорилирования (Ser366). Фосфорилирование по этому сайту осуществляется протеинкиназой TBK1 (TANK-binding kinase 1) и приводит к устойчивой активации STING. Кроме фосфорилирования STING подвергается пальмитированию, что способствует образованию агрегатов STING с TBK1 и формированию STING–TBK1-сигналосомы [5]. Далее TBK1 в составе STING-сигналосомы фосфорилирует транскрипционный фактор IRF3 (IFN regulatory factor 3), что приводит к его димеризации и транслокации в ядро, где он связывается с промоторами интерфероновых генов I типа. Кроме индукции интерферонов I типа STING–TBK1-сигналосома также может быть вовлечена в экспрессию других провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-6 (IL-6) и фактор некроза опухолей (TNF) за счет фосфорилирования I κ B α , ингибитора транскрипционного фактора NF- κ B, и дальнейшего его полиубиквитилирования и деградации. Деградация I κ B α способствует активации и переходу в ядро NF- κ B, регулирующего экспрессию разных цитокинов [6].

Известно, что активация сигнального пути cGAS–STING и продукция цитокинов может снижать темпы прогрессии опухолей [7], оказывая влияние на специфический противоопухолевый иммунитет, что делает его привлекательной мишенью для разработки STING-таргетированной терапии рака. Следует, однако, отметить, что гиперпродукция цитокинов (в частности интерферонов I типа) может быть причиной развития аутоиммунных заболеваний, а также длительного воспаления при разных заболеваниях, что следует учитывать при применении STING-направленных препаратов. Таким образом, поиск и изучение не только агонистов (активаторов), но и антагонистов (ингибиторов) STING может стать актуальным направлением современных исследований. Кроме того, недавно было показано, что STING также принимает участие в регуляции Сар-зависимой трансляции мРНК путем прямого связывания с протеинкиназой PERK в ЭПР при фиброзе легких и почек, что расширяет перечень заболеваний для лечения которых могут быть применены STING-таргетированные препараты [8].

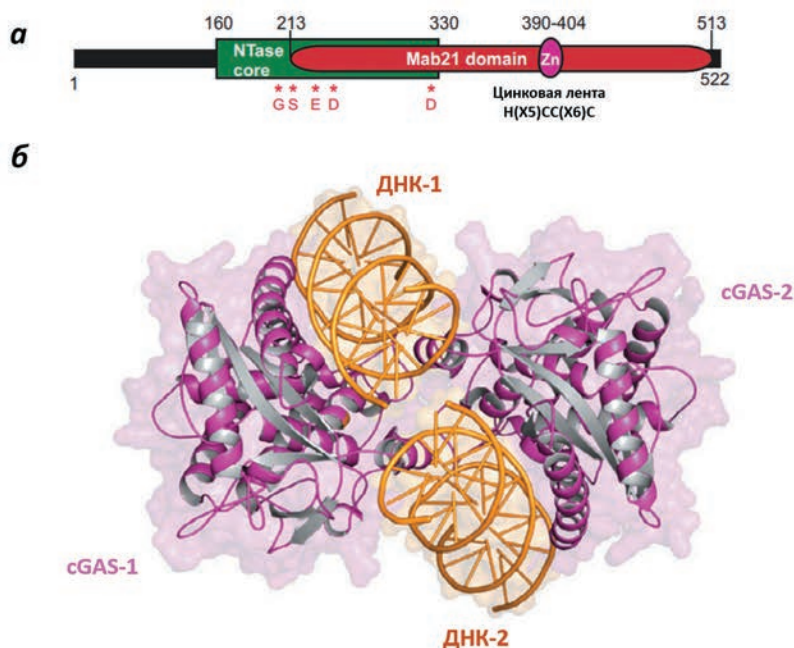


Рис. 2. Схема доменной организации cGAS человека (а) и модель комплекса cGAS–ДНК (2:2) (б), в составе которого каждый мономер cGAS взаимодействует с ДНК (адаптировано из [10, 11], используется с разрешения издательства). а — N-конец обозначен черным цветом, С-конец состоит из нуклеотидилтрансферазного домена (NTase core) (зеленый цвет) и Mab21-домена (красный цвет), включающего структуру «цинковая лента» (H(X5)CC(X6)C). Красными звездочками отмечены аминокислотные остатки (G212, S213, E225, D227 домена).

cGAS

Белок cGAS впервые был обнаружен как сенсор ДНК в цитоплазме клеток L929 и THP-1 [9]. cGAS имеет молекулярную массу 60 кДа и представляет собой циклическую GMP–AMP-синтазу из семейства нуклеотидилтрансфераз, преимущественно локализуется в цитоплазме, а также может находиться в ядре. cGAS состоит из неструктурированного N-конца (1–160 а.о.) и высококонсервативного С-конца (161–522 а.о.) (рис. 2). Предполагается, что остатки лизина и аргинина, входящие в состав N-концевого фрагмента, участвуют в связывании ДНК. Кроме этого, N-конец служит для присоединения cGAS к плазматической мембране. С-конец cGAS содержит два сильно консервативных домена — нуклеотидилтрансферазный домен (160–330 а.о.), необходимый для ферментативной активности, и Mab21-домен (213–513 а.о.), включающий мотив «цинковая лента», который участвует в связывании ДНК и димеризации cGAS, и остаток лейцина, регулирующий синтез циклических динуклеотидов [12]. В отсутствие ДНК cGAS находится в автоингибированном состоянии. При нахождении нуклеиновых кислот в цитоплазме

cGAS димеризуется и формируется комплекс cGAS–ДНК (2:2).

Внутри комплекса cGAS–ДНК происходят конформационные изменения, и осуществляется переход cGAS в активное состояние и каталитический синтез циклического гуанозинмонофосфата–аденозинмонофосфата 2',3'-cGAMP из АТФ и ГТР. 2',3'-cGAMP является смешанным фосфодиэфиром с уникальной связью между 2'-ОН группой GMP и 5'-фосфатным остатком AMP и 3'-ОН группой AMP с 5'-фосфатными остатком GMP (см. формулу на рис. 1). 2',3'-cGAMP выступает в роли вторичного мессенджера и связывается с белком ЭПР STING, вызывая его активацию и последующую продукцию интерферонов I типа [13]. Взаимодействие между нуклеиновыми кислотами и ДНК-связывающими доменами cGAS происходит посредством формирования связи между положительно заряженными аминокислотными остатками (а.о.) и отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК, что позволяет связывать дцДНК в независимости от ее последовательности. cGAS может активироваться и при взаимодействии с оцДНК, способной сформировать внутренние дуплексные структуры, а также при взаимодействии с оцДНК в Y-форме

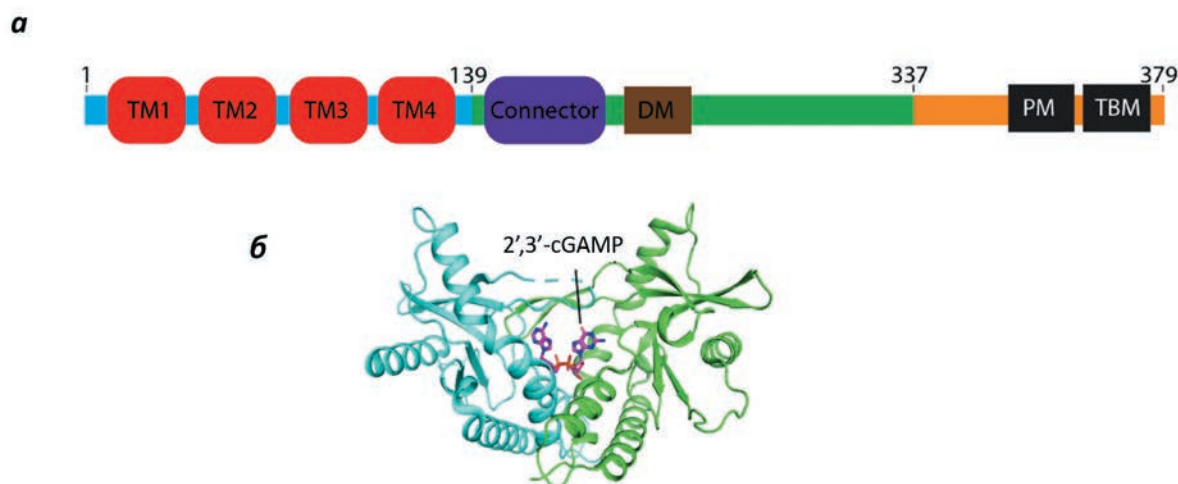


Рис. 3. Схема доменной организации белка человека STING (а) и модель комплекса лиганд–STING (б) (адаптировано из [27], используется с разрешения издательства). а — N-концевой участок выделен голубым цветом, LBD (лиганд-связывающий домен) выделен зеленым цветом, СТТ (С-концевой фрагмент) выделен оранжевым цветом; б — взаимодействие между лигандом 2',3'-cGAMP и лиганд-связывающим доменом белка свиньи STING происходит в частично открытой конформации.

[14]. дцРНК может связываться с белком cGAS, но в отличие от дцДНК, это не приводит к его активации, что позволяет предположить, что для активации требуются специфические структурные перестройки в молекуле фермента, вызываемые дцДНК, а не дцРНК [15]. Предполагается, что В-форма ДНК связывается с активационной петлей cGAS и сдвигает ее, что приводит к перегруппировке активного сайта и активации cGAS, в то время как А-форма дцРНК не способна сдвинуть активационную петлю и не может активировать cGAS [16]. Для активации cGAS *in vitro* достаточно коротких дцДНК (примерно 15 п.о.), но для активации cGAS в клетках необходимы более длинные фрагменты ДНК (свыше 20 п.о.). Длинные фрагменты ДНК формируют с cGAS более стабильные структуры димеров с более высокой ферментативной активностью [17]. Для оцДНК связывающая способность составляет $K_d \sim 1.5 \text{ мкМ}$, а для дцДНК $K_d \sim 87.6 \text{ нМ}$ [18]. cGAS узнает такие ДНК-содержащие вирусы: вирус коровьей оспы, вирус простого герпеса 1 и 2 типа (HSV1 и HSV2), цитомегаловирус, аденовирусы, вирус папилломы человека и мышинный гаммагерпесвирус 68, а также РНК-содержащие вирусы: вирус мышинного лейкоза, вирус иммунодефицита африканских обезьян (SIV), вирус иммунодефицита человека (HIV), вирус лихорадки Западного Нила, вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус денге, а также грамположительные и грамотрицательные бактерии [19]. Интересно отметить, что при инфицировании

дендритных клеток РНК-содержащим вирусом HIV-1 cGAS функционирует не самостоятельно, а в комплексе с белком PQBP1, что, по всей видимости, требуется для усиления узнаваемости обратно транскрибируемой ДНК ретровируса [20]. Известно, что активность cGAS регулируется за счет посттрансляционных модификаций, таких как, например, фосфорилирование по Ser305 (у человека) и по Ser291 (у мышей) протеинкиназой Akt [21], а также глутамилирование TTLL4 и TTLL6 [22], приводящих к ингибированию активности cGAS. Белок cGAS может присутствовать в ядре, однако автореактивность к собственной ДНК подавлена из-за взаимодействия с хроматином [23]. cGAS связан с гистонами 2A-2B, что предотвращает формирование димеров cGAS [24].

Sun и соавторы показали, что фермент cGAS, катализируя образование вторичного мессенджера 2',3'-cGAMP, участвует в продукции интерферона через белок STING [9]. Инфицирование клеток с нокаутом cGAS ДНК вирусами не вызвало активацию IRF3 и продукцию интерферона β (IFN- β), а в клетках с оверэкспрессией cGAS ДНК-вирусы активировали IRF3 и индуцировали STING-зависимую продукцию IFN- β .

В настоящее время предпринимаются попытки синтезировать агонисты cGAS — циклические нуклеотиды, олигонуклеотиды, которые бы имели высокую биостабильность, фармакинетику, безопасность и высокий потенциал в стимуляции иммунного ответа в опухолевом микроокружении

и невысокую стоимость при комбинированной иммунотерапии [25].

STING

Белок STING считается одной из ключевых молекул, участвующих в реакции на патогены и активирующий провоспалительные цитокины при адаптивном иммунном ответе. Впервые STING был обнаружен в экспериментах с применением скрининговой системы экспрессии, в которой примерно 5500 человеческих и 9000 мышиных полноразмерных комплементарных кДНК, содержащих репортерный ген люциферазы под промотором IFN- β -Luc, были трансфицированы в клетки HEK293T, для того чтобы определить участников альтернативного TRL-независимого сигнального пути врожденного иммунитета, сопровождающегося продукцией интерферонов [26]. В результате этой работы был идентифицирован белок STING (молекулярный вес 42 кДа, 379 а.о.), который преимущественно располагался в ЭПР. STING закорен в ЭПР N-концевым фрагментом, включающим четыре трансмембранных домена (TM1–TM4). В структуре STING присутствует лиганд-связывающий домен (LBD), содержащий участок для взаимодействия (Connector) и димеризующий мотив (DM), и C-концевой фрагмент (CTT), включающий фосфорилируемый мотив (PM) и мотив для связывания протеинкиназы TBK1 (TBM) (рис. 3).

Лиганд-связывающий домен подвергается конформационным изменениям при связывании с эндогенным вторичным мессенджером 2',3'-cGAMP. Связывание STING с 2',3'-cGAMP в отличие от других изомеров, таких как, например, 3',2'-cGAMP и 2',2'-cGAMP, происходит в наиболее предпочтительной конформации, которая позволяет с наименьшей энтропией и высокой аффинностью реализовать их взаимодействие. Константа связывания со STING для 2',3'-cGAMP ~ 4 нМ и в 300 раз ниже, чем для 3',2'-cGAMP и 3',3'-cGAMP, и в 75 раз ниже, чем для 2'2'-cGAMP [28]. Показано, что STING может напрямую связываться с ДНК без участия других белков, но аффинность такого связывания ($K_d \sim 200$ –300 мкМ) ниже, чем у cGAS ($K_d \sim 88$ нМ) [29]. Мономеры STING формируют гомодимеры в клетках. При связывании лигандов с мономерами STING происходит образование тетрамеров и олигомеров высшего порядка [30]. После образования тетрамеров происходит перемещение STING из ЭПР в ЭПР–Гольджи промежуточный компартмент и аппарат Гольджи. В аппарате Гольджи происходит присоединение пальмитиновой кислоты

к цистеиновым остаткам STING (Cys88 и Cys91), что оказывает влияние на активацию STING [31]. Для активации STING также необходимо фосфорилирование C-концевого домена протеинкиназой TBK1 [32]. Далее TBK1, предположительно находясь в составе STING–TBK1-сигнасомы, фосфорилирует транскрипционный фактор IRF3. В состоянии фосфорилирования IRF3 образует гомодимеры, которые транслоцируются в ядро и регулируют транскрипцию IFN- β [33].

Активность STING регулируется путем убиквитилирования. Присоединение убиквитина по разным сайтам STING (Lys63 — E3-лигазы TRIM56 и TRIM32; Lys27 — Grp78/AMFR и INSIG1) либо вызывает продукцию интерферона [34, 35], либо ингибирует продукцию интерферона и вызывает деградацию STING (Lys48 — RNF5 и TRIM30a) [36, 37].

Участие STING в активации продукции интерферонов было исследовано на нокаутных по STING $^{-/-}$ мышах [38]. В клетках MEFs (мышинные эмбриональные фибробласты), выделенных из STING $^{-/-}$ мышей, при заражении вирусом герпетического стоматита наблюдалось образование большего вирусного потомства по сравнению с клетками дикого типа. В STING $^{-/-}$ MEFs индуцированная гиперэкспрессия STING после трансфекции плазмиды pcDNA mSTING приводила к увеличению уровня мРНК *Ifnb* и белка IFN- β . В макрофагах STING $^{-/-}$, полученных из костного мозга, действие полиинозиновой-полицитидиловой кислоты (poly I: C), но не инфицирование грамотрицательными бактериями *Flutarenensis*, вызывало повышение экспрессии мРНК *Ifnb*. У нокаутных STING $^{-/-}$ мышей некоторые виды бактерий (*L. monocytogenes*), вирусов (HSV1) и ДНК, не содержащих CpG, не вызывали продукцию интерферонов, а приводили к продукции интерлейкинов (IL-1 β). Это указывает на специфичность врожденного ответа на разные типы патогенов у разных типов клеток, в которых активируются либо STING-зависимые, либо TLR-зависимые сигнальные пути [39]. Участие TBK1 в STING-зависимом сигнальном пути также было показано на TBK1 $^{-/-}$ мышах. В клетках MEFs, полученных от TBK1 $^{-/-}$ мышей, сигнальный путь с участием STING не активировался [38]. Роль STING, как вышестоящего звена в сигнальном пути STING–TBK1–IRF3, была показана в экспериментах с гиперэкспрессией STING в клетках HEK293T. Повышение экспрессии STING приводило к димеризации IRF3 и стимулировало продукцию интерферонов и других генов первичного иммунного ответа (*Ifnb1*, *Ifna4*, *Ifna6*, *Isgf3g*, *Irf2*, *Irf6*) [40].

В опухолевом микроокружении эндотелиальные клетки, наряду с дендритными клетками

и фибробластами, являются основным источником STING-зависимой продукции IFN- β [41]. IFN- β является эффективным антиангиогенным цитокином, который может подавлять пролиферацию или выживаемость эндотелиальных клеток, а также формирование капиллярной сети в опухолевом микроокружении, и вовлекается в противоопухолевый иммунитет. Показано влияние интерферонов (IFN- α и IFN- β) в противоопухолевом иммунитете и на другие типы иммунных клеток. Так, например, при связывании с клетками, несущими рецепторы к интерферону, интерферон снижает уровень кислотности в эндосомально-лизосомальном компартменте дендритных клеток, усиливает презентацию антигенов дендритными клетками, повышает продукцию хемокинов (CXCL9 и CXCL10) антигенпрезентирующими клетками, усиливает миграцию CD8⁺ Т-клеток и натуральных киллеров [42].

Активация STING-зависимого сигнального пути, приводящего к продукции интерферонов, в опухолевом микроокружении потенциально может способствовать эффективной противоопухолевой терапии при использовании агонистов STING циклических динуклеотидов (CDN, cyclic dinucleotide) или других малых молекул, не относящихся к циклическим динуклеотидам (non-CDN). Одним из первых агонистов STING, примененных в клинических испытаниях для иммунотерапии рака, был циклический динуклеотид ADU-S100 (MIW815). Этот агонист эффективно активировал STING *in vitro* и *in vivo* у мышей и при локальном введении инициировал CD8⁺ Т-клеточный ответ, что приводило к острой продукции цитокинов и локальному сосудистому коллапсу, и регрессии опухолей [43, 44]. Клинические испытания I фазы показали, что при монотерапии данный агонист хорошо переносится пациентами с солидными опухолями и лимфомами, и у пациентов наблюдается системная иммунная активация (повышение уровня воспалительных цитокинов, клональная экспансия Т-клеток периферической крови) [45]. Предполагается, что комбинация ADU-S100 с ингибиторами контрольных точек может привести к повышению эффективности иммунотерапии, но для подтверждения этой гипотезы требуются дальнейшие клинические испытания. Другим перспективным агонистом STING, дошедшим до клинических испытаний, был DMXAA (ASA404 или Vadimezan), аналог ксантенона. DMXAA действует двунаправленно и способен вызывать апоптоз эндотелиальных опухолевых клеток, что приводит к разрушению сосудов в опухоли и прекращению снабжения кровью опухолевых узлов, и активации продукции провоспалительных

цитокинов посредством STING. Успешные I и II фазы клинических испытания привели к III фазе, которая показала отрицательный результат из-за того что изоформы STING у мышей и у человека имеют структурные различия в сайте связывания с DMXAA. Эти различия не позволяют STING связываться с DMXAA в клетках человека. Дальнейшие перспективы использования данного соединения или его модификаций при терапии рака связывают с его применением в комбинированной терапии с препаратами анти-ангиогенеза, радиотерапией и другими подходами [46]. В настоящее время к перспективным агонистам STING относится соединение diABZI (non-CDN), показавшее хороший эффект при терапии опухоли толстой кишки. Так, у мышей с сингенной опухолью толстой кишки при внутривенном введении наблюдается полная и длительная регрессия опухоли [47]. Интересно отметить, что в литературе описан еще один эффективный non-CDN агонист STING, MSA-2, показавший эффективность не только при внутриопухолевом и подкожном введении мышам, но и при пероральном введении. MSA-2 имеет высокую клеточную проницаемость и аффинность к STING. В кислой среде в опухолевых клетках MSA-2 формирует нековалентно связанные димеры, которые взаимодействуют со STING. Комбинированная терапия MSA-2 с анти-PD1 показала большую эффективность [48].

Таким образом, исследование механизмов действия агонистов STING—TBK1—IRF3 сигнального пути с целью выявления наиболее перспективных соединений для терапии разных типов рака является крайне актуальной задачей и, как описано выше, в наши дни некоторые соединения уже дошли до клинических испытаний, но поиск новых эффективных агонистов для терапии рака продолжается.

IFI16 и AIM2

Белки IFI16 и AIM2, относящиеся к семейству PYHIN (также известные как p200 или HIN200), другие важные сенсоры нуклеиновых кислот, которые встают на защиту клеток при вторжении вирусов, бактерий и других патогенов, или собственной aberrантной цитоплазматической ДНК. У большинства белков этого семейства в структуре N-концевого фрагмента находится пириновый домен (PYD), обеспечивающий белок-белковые взаимодействия, а С-концевой фрагмент включает один или два HIN200-домена, участвующие в связывании ДНК.

Белок IFI16 был одним из первых обнаруженных цитоплазматических сенсоров ДНК (IFN γ -inducible protein 16), который реагирует на

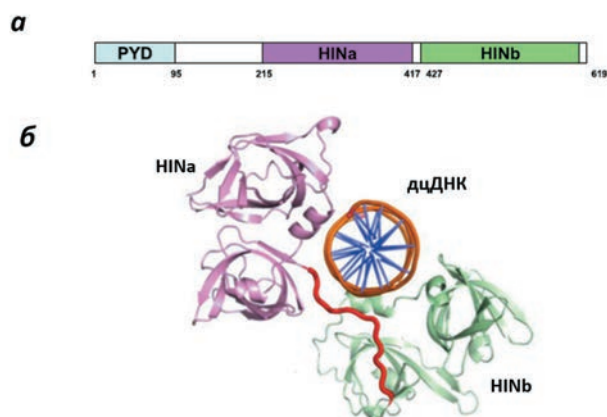


Рис. 4. Схема доменной организации белка IFI16 мыши (а) и модель комплекса дцДНК с HINa- и HINb-доменами, связанными между собой линкером (красный цвет) (б) (адаптировано из [51], используется с разрешения издательства).

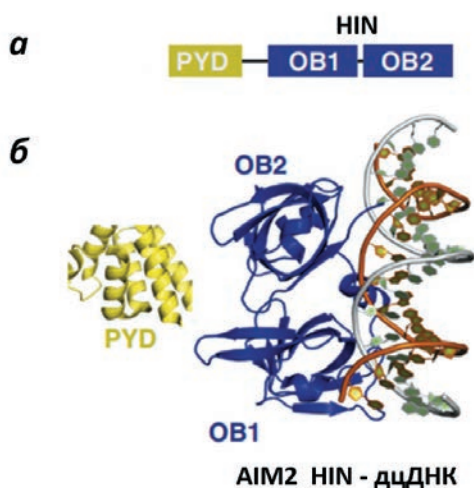


Рис. 5. Схема доменной организации AIM2 (а) и модель структуры PYD-домена (лимонный цвет) и комплекса дцДНК–AIM2 (б) (адаптировано из [63], используется с разрешения издательства). OB1, OB2 — олигонуклеотид/олигосахарид связывающие складки в составе HIN200-домена.

присутствие в цитоплазме оцДНК и дцДНК [49]. IFI16 локализуется преимущественно в ядре и в небольшом количестве в цитоплазме [50]. Структура доменной организации IFI16 представлена на рис. 4. В состав IFI16 входит N-концевой PYD-домен и два тандемных домена: HINa и HINb, содержащие олигонуклеотид/олигосахарид связывающие складки (OB).

Показано, что связывание дцДНК с HIN-доменами происходит по механизму кооперативного связывания

и зависит от длины ДНК [52, 53]. Связывание с оцДНК или с дцДНК происходит в основном за счет электростатического взаимодействия. IFI16 способен узнавать разную топологию ДНК [54]. Оба домена HINa и HINb связывают ДНК, но аффинность связывания различается [55]. HINa связывает ДНК быстрее, чем HINb. HINb связывает GC-богатые ДНК сильнее, чем HINa. Домен HINb взаимодействует с двумя цепочками ДНК, в то время как HINa взаимодействует с одной цепочкой ДНК. Предполагается два способа связывания ДНК с HIN-доменами. Первый способ — линкер, соединяющий две олигонуклеотид/олигосахарид связывающие складки внутри домена, используется в качестве троса для связывания с ДНК, второй способ — петли внутри двух олигонуклеотид/олигосахарид связывающих складок HIN-домена используются для связывания ДНК [56, 57]. Предполагается, что разные способы взаимодействия с ДНК, а также связь ДНК с разными доменами (взаимодействие с HINa ослабляет экспрессию IFN- β , а взаимодействие с HINb усиливает IFN- β [58]), могут приводить к двум разным иммунным ответам, а также в зависимости от типа вирусов, проникающих в клетку, IFI16 активирует различные способы борьбы с вирусами. При попадании генетического материала вирусов в ядро IFI16 перемещается к периферии ядра, ближе к ядерным порам, где связывает проникающую в ядро вирусную ДНК через HIN-домены и олигомеризуется через PYD-домен [59]. Известны следующие реакции в клетках в ответ на проникновение разных вирусов с участием IFI16: активация STING-зависимого интерферонового ответа (при инфекции HSV-1); формирование провоспалительного олигомерного комплекса белков — инфламасомы (при KSHV-инфекции); активация каспазы-1, инициирующей пироптоз (при HI-инфекции) [50, 60]. В макрофагах при подавлении экспрессии IFI16 при стимуляции синтетической ДНК нарушалась продукция cGAMP, а при оверэкспрессии IFI16 усиливалась продукция cGAMP, что дало основание предполагать, что IFI16 функционирует как кофактор cGAS, оказывая влияние на продукцию cGAMP и дальнейший STING-зависимый сигнальный каскад [61].

AIM2 (absent in melanoma 2) — другой белок из этого семейства, преимущественно экспрессируется в эпителиальных клетках кишечника, кератиноцитах и моноцитарных линиях, способен распознавать ДНК из разных источников (собственную ДНК, бактериальную и вирусную ДНК). Показано, что AIM2 узнает вирус коровьей оспы и мышинный цитомегаловирус [62]. Структурно AIM2 включает два домена: N-концевой пириновый домен

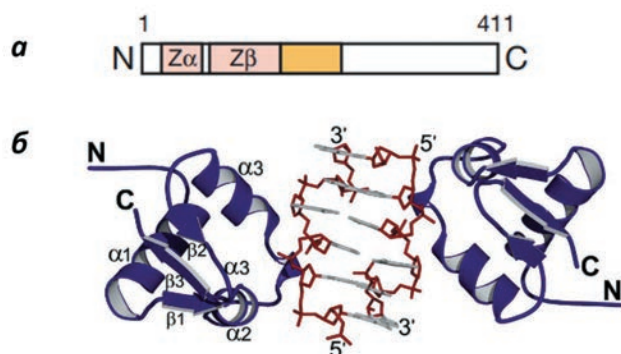


Рис. 6. Схема доменной организации ZBP1 (а) и модель структуры комплекса Z-ДНК с двумя молекулами ZBP1 (б) (адаптировано из [71, 74], используется с разрешения издательства). а — Розовым показаны Zα- и Zβ-домены, связывающие Z-форму ДНК; желтым показан D3-регион, участвующий в связывании правозакрученной В-формы ДНК. б — дцДНК (коричневый цвет), молекулы ZBP1 (фиолетовый цвет).

(PYD) и С-концевой HIN200-домен, соединенных длинным линкером (рис. 5). HIN200-домен, заряжен положительно и связывает отрицательно заряженную ДНК [64].

Предполагается, что PYD-домен в состоянии покоя блокирует HIN-домен посредством межмолекулярных взаимодействий, что предотвращает олигомеризацию PYD-доменов. В случае связывания дцДНК PYD-домен вытесняется из взаимодействия с HIN-доменом и может взаимодействовать с адаптерным белком инфламماسомы ASC, также имеющим в своем составе PYD-домен [56]. Sohn и соавторы предложили другую модель взаимодействия ДНК с AIM2. Они предполагают, что PYD-домен не вовлечен в автоингибирование AIM2, а, наоборот, участвует в связывании с ДНК и последующей олигомеризации PYD-доменов для формирования AIM2-инфламماسомы [65]. Исследование структуры HIN-домена AIM2 со связанной ДНК показало, что ДНК взаимодействует с AIM2 через сахарофосфатный остов, то есть независимо от последовательности ДНК [56]. Сахарофосфатные остатки обеих цепочек ДНК (В-форма) взаимодействуют с аргинином и лизином HIN-домена через электростатическую связь. Например, для стимуляции продукции цитокинов (IL-1β) при связывании ДНК с AIM2 требуется минимальная длина ДНК ~ 80 п.о. Результаты криоэлектронных исследований показали, что одну молекулу ДНК связывает множество молекул

AIM2, которые способны взаимодействовать друг с другом через PYD-домены и формировать длинные спиральные нити с полой правосторонне закрученной структурой. Внутренний диаметр такой нити составляет ~ 20 Å, а наружный диаметр ~ 90 Å [66]. Нити, сформированные белком AIM2, являются иницирующим фактором для дальнейшей сборки инфламماسомы — супрамолекулярного мультибелкового комплекса, включающего адаптерный белок ASC, способный взаимодействовать с CARD-доменом прокаспазы-1. После сборки инфламماسомы происходит автокаталитическое расщепление прокаспазы-1 до каспазы-1, которая конвертирует про-IL-18 и про-IL-1β в их активные формы, что приводит к воспалительному ответу и пироптозу [67].

Участие AIM2 в сигнальном каскаде STING пока остается плохо изученным. В ряде работ продукция интерферонов наблюдалась в AIM2-дефицитных моделях. В спленоцитах AIM2-дефицитных мышей наблюдается повышенная экспрессия IFN-β и других IFN-индуцируемых генов [68]. В антигенпрезентирующих клетках (мышинные макрофаги и дендритные клетки) при стимуляции ДНК *in vitro* наблюдалась активация AIM2-инфламماسомы, каспазы-1 и снижение продукции IFN-β [69]. Предполагается, что эффективным дополнением стратегии повышения Т-клеточного ответа при терапии рака за счет активации сигнального каскада STING, приводящего к продукции IFN-β в опухолевом микроокружении, может стать ингибирование индукции AIM2-инфламماسомы. Действительно было показано, что, например, продукция цитокина IL-1R ингибирует продукцию IFN-β, а ингибирование AIM2-зависимой продукции интерлейкинов может повысить продукцию интерферонов [70].

DAI (ZBP1)

Поиск цитоплазматических сенсоров ДНК, которые способны активировать сигнальный путь TBK1–IRF3, привел к идентификации DAI (DNA-dependent activator of IRFs), известного также как ZBP1 [71]. ZBP1 локализуется в цитоплазме и ассоциирован со стрессовыми гранулами и тельцами, участвующими в обороте мРНК [72]. Структура ZBP1 включает три ДНК-связывающих домена, расположенных на N-конце, и домены, участвующие в связывании TBK1 и IRF3, расположенные на С-конце [73]. N-конец состоит из 2 tandemных Z-ДНК-связывающих доменов (Zα и Zβ, ZBDs) и третьего ДНК-связывающего региона (D3), способного связывать правозакрученную В-форму ДНК [71] (рис. 6).

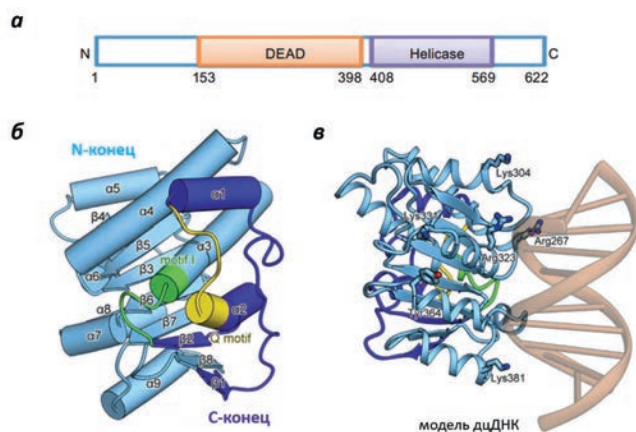


Рис. 7. Схема доменной организации DDX41 (а), модель структуры закрытой конформации DEAD-домена (б) и докинг модель комплекса DEAD-домена, связанного с дцДНК (в) (адаптировано из [85, 86], используется с разрешения издательства).

Структура ZBDs состоит из трех α -спиралей и трех β -складок, в составе которых находятся консервативные аминокислотные остатки, вовлеченные в связывание с Z-конформацией ДНК. Показано, что в узнавании доменами ZBDs зигзаг формы ДНК принимает участие $\alpha 3$ -спираль и β -складки ($\beta 2$ и $\beta 3$) [74–76]. Важную роль играют положительно заряженные или полярные аминокислотные остатки, а также прямые ионные взаимодействия, водородные связи, образуемые фосфатными остатками остова ДНК и гидрофобные взаимодействия (Trp, Thr, Pro) [77]. Исследования показали, что оба домена $Z\alpha$ и $Z\beta$ одновременно связываются с Z-формой ДНК. При исследовании $Z\beta$ -домена белка человека была показана уникальная кристаллическая структура домена, формируемая для узнавания Z-формы ДНК, а также способность этого домена осуществлять конвертацию B-формы в Z-форму [74]. Предполагается, что с одной молекулой дцДНК могут связаться 2 молекулы DAI, что приводит к димеризации DAI и усилению иммунного ответа. Для активации сильного иммунного ответа в ответ на ДНК необходимо наличие всех трех доменов в составе DAI [78].

Такаока и соавторы продемонстрировали индукцию генов интерферонов I типа в ответ на дцДНК в мышечных фибробластах L929 с повышенным уровнем экспрессии DAI, а в клетках со сниженной экспрессией DAI ингибирование их индукции [71]. После связывания дцДНК с DAI, DAI копреципитирует одновременно с протеинкиназой TBK1 и с транскрипционным фактором IRF3, что указывает на его прямую или непрямую ассоциацию с этими

белками. Предполагается, что формирование данного комплекса ZBP1(DAI)–TBK1–IRF3 активирует IRF3 и вызывает транслокацию IRF3 в ядро.

Дальнейшие исследования на DAI-дефицитных мышцах и эмбриональных фибробластах показали нормальный уровень продукции интерферонов в ответ на вирусную ДНК [79]. Снижение экспрессии ZBP1 не оказывало влияние на активацию IRF3–TBK1 сигнального пути и продукцию IFN- β в клетках A549 и HepG2 [80, 81]. В разных типах клеток экспрессия ZBP1 варьирует, а регуляция ZBP1 сигнальных каскадов представляется довольно сложной, поскольку наряду с активацией IRF3 в клетках активируется NF- κ B за счет присутствия в составе ZBP1 RHIMs-мотивов, вовлеченных в активацию протеинкиназ RIPK1 и RIPK3 [82]. Так, например, в кардиомиоцитах при действии доксорубина происходит выход мтДНК в цитоплазму, что вызывает повышение экспрессии *Zbp1*, интерферонов I типа и других интерферон-стимулируемых генов (interferon-stimulating genes, ISGs). При снижении экспрессии *Ifnar*^{−/−}, *Sting*^{−/−}, и *Zbp1*^{−/−} в кардиомиоцитах эффект доксорубина на экспрессию ISGs отсутствует. Выход мтДНК в цитоплазму кардиомиоцитов приводит к формированию комплекса ZBP1–cGAS–RIPK1–RIPK3, фосфорилированию STAT1 и интерфероновому ответу. Формирование комплекса ZBP1–cGAS происходит за счет связывания N-концевого RHIM-домена ZBP1 с ДНК-связывающим доменом cGAS. Предполагается, что этот комплекс задействован в поддержании интерферонного ответа клетками при митохондриальной дисфункции [83]. Это дает основание полагать, что сигнальная ось ZBP1–cGAS–STING вовлечена в интерфероновый ответ в клетках сердца, а влияние на этот путь может снизить доксорубин-индуцированную кардиотоксичность. Происходит ли формирование подобного комплекса между ZBP1 и cGAS в иммунокомпетентных клетках еще предстоит выяснить. Таким образом, ZBP1 (DAI) может быть крайне необходимым сенсором ДНК для активации интерферонного ответа, но активироваться в клетках в зависимости от их типа.

DDX41

DDX41 (DEAD-box helicase 4) РНК-хеликаза — цитоплазматический сенсор нуклеиновых кислот, который участвует в узнавании вирусов, например, вируса HSV-1 и аденовируса, в разных типах клеток: в миелоидных дендритных клетках и мышечных дендритных клетках из костного мозга и других. DDX41 относится к семейству DExD/H-box РНК-хеликаз, вовлеченных

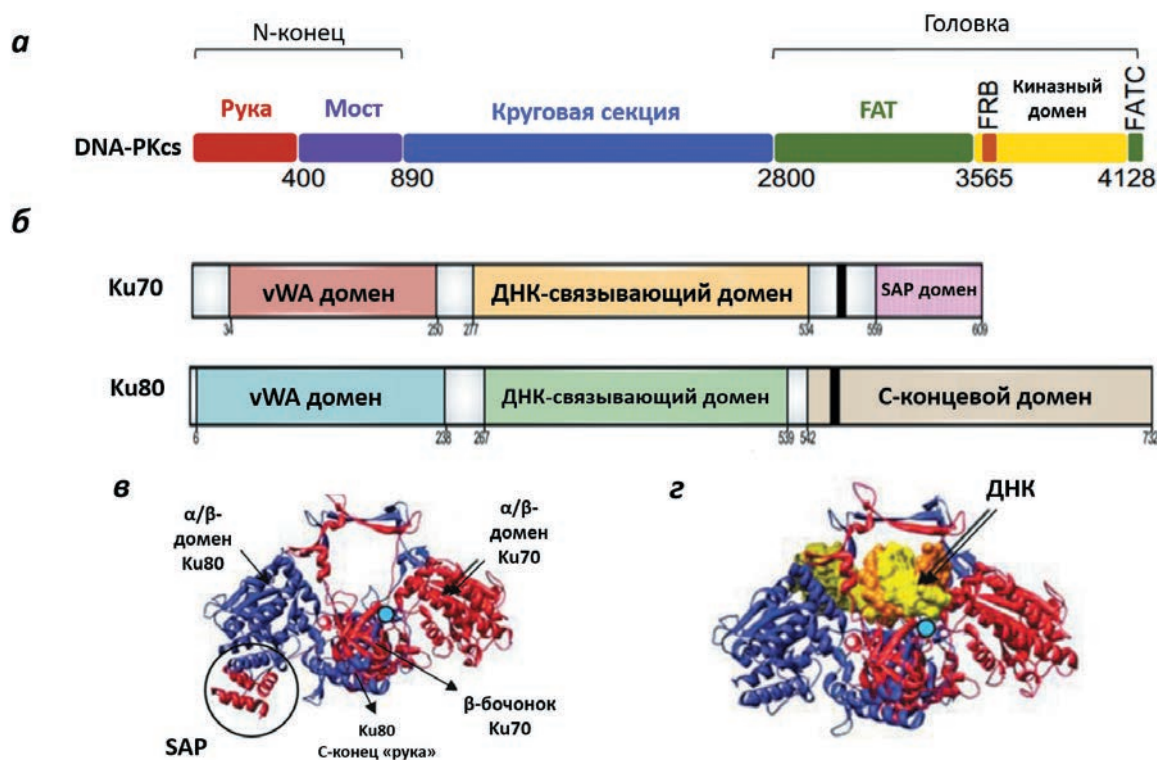


Рис. 8. Схема доменной организации DNA-PKcs (а) и субъединиц Ku70, Ku80 человека (б), модель вторичной структуры димерного комплекса субъединиц Ku80 (фиолетовый цвет) и Ku70 (красный цвет) (в) и комплекса ДНК (желто-оранжевый цвет) с гетеродимером Ku70—Ku80 (г) (адаптировано из [94–96], используется с разрешения издательства). Аминокислота, после которой начинается специфичная для субъединицы Ku70 аминокислотная последовательность, отмечена голубой заполненной точкой.

в продукцию интерферонов I типа [84]. В структуре белка DDX41 присутствуют хеликазный домен (HELIC) и домен DEAD/H-box, имеющие разные функциональные мотивы (рис. 7).

Домен HELIC содержит консервативные I- и Q-мотивы, которые участвуют в связывании и гидролизе ATP, а DEAD-домен содержит такие мотивы, как Q-мотив, Р-петлю, Ia-мотив, Ib-мотив, мотив II, мотив III. Считается, что Р-петля в составе DEAD-домена связывает дцДНК и циклические динуклеотиды, а также согласно модели молекулярного моделирования (докинг модель) предполагается, что в формирование сайта связывания ДНК вовлечены аминокислотные остатки: Arg267, Lys304, Tyr364, Lys381, расположенные на С-конце. Домен HELIC, вероятнее всего, способен ингибировать связывание между DEAD/H-box-доменом и его лигандами [87]. Предполагается прямое взаимодействие DDX41 со STING, которое приводит к повышению продукции интерферона I типа. Zhang и соавторы выявили, что из большого числа членов семейства DExD/H-box-хеликаз только при нокауте DDX41 в миелоидных дендритных

клетках и моноцитах человека значительно снижается продукция IFN- β в ответ на трансфекцию poly(dA-dT). Интересно, что при заражении клеток РНК-вирусами, такой эффект не был обнаружен. DDX41 является сенсором бактериальных вторичных мессенджеров cGMP и cAMP, появление которых в цитоплазме приводит к активации интерферон-зависимого иммунного ответа [88]. В моноцитах и макрофагоподобных клетках с нокаутом DDX41 нарушалась активация cGAS и STING [89]. На основании этих данных было сделано заключение о том, что DDX41 является STING-зависимым сенсором ДНК. Однако в зависимости от типа клеток и типа вируса, вовлечение DDX41 в те или иные сигнальные пути может отличаться. Так, например, было показано, что подавление экспрессии DDX41 с помощью РНК-интерференции (RNAi) в клетках hTERT не сильно влияло на продукцию IFN- β при заражении клеток вирусной ДНК (HSV1 или бакуловиром) [90].

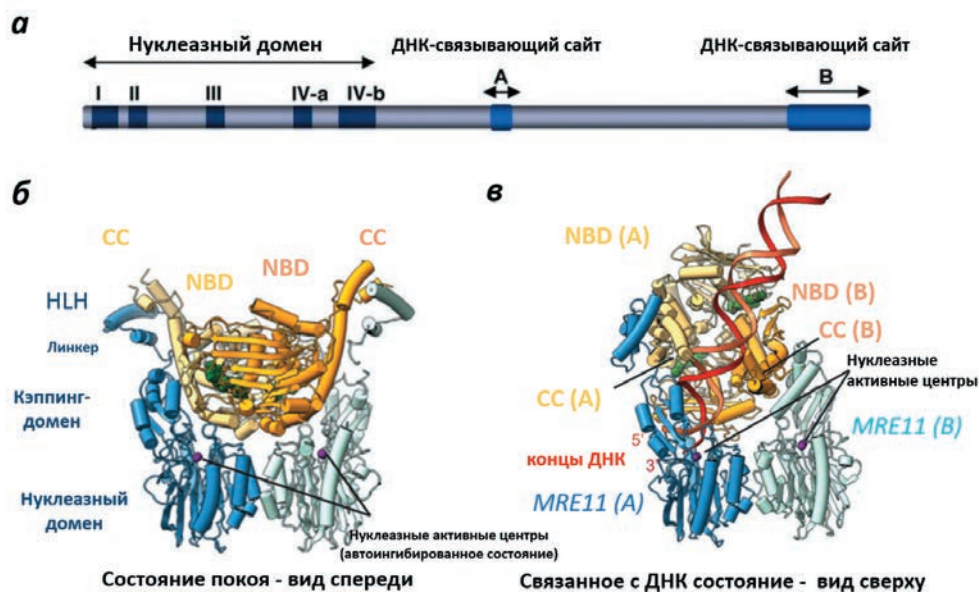


Рис. 9. Схема доменной организации MRE-11 (а) и модель комплекса *E. coli* MRE11–RAD50 в состоянии покоя (б) и в связанном с ДНК состоянии (в) (адаптировано из [102, 103], используется с разрешения издательства). Связывание ДНК вызывает сдвиг в нуклеотид-связывающих доменах (NBD) и перестройки в MRE-11, что приводит к формированию канала в области активных центров и зажиму концов ДНК. HLH — спираль-петля-спираль, CC — двойная спираль.

DNA-PK и MRE-11

Белок ДНК-зависимая протеинкиназа DNA-PK (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit) вовлечен в репарацию разрывов и повреждений ДНК. При нахождении в ядре DNA-PK участвует в репарации разрывов дцДНК [91], а при нахождении в цитоплазме участвует в иммунном ответе при проникновении патогенов [92]. DNA-PK относится к семейству Ser/Thr PIKK-протеинкиназ, способных к автофосфорилированию и фосфорилированию других эффекторов репарации [93]. DNA-PK представляет собой гетеротримерный белковый комплекс (460 кДа), который включает три субъединицы: Ku70 (70 кДа), Ku80 (86 кДа) и каталитическую субъединицу DNA-PKcs.

Субъединица DNA-PKcs состоит из нескольких доменов: N-концевого участка, включающего руку (красный цвет), мост (темно-фиолетовый цвет) и круговую секцию (сине-фиолетовый цвет); головки, включающей FAT (FRAP–ATM–TRRAP) (зеленый цвет), FRB (FKBP12-rapamycin-binding) (оранжевый цвет), киназный (желтый цвет) и FATC (FAT C-terminal) (темно-зеленый цвет) домены (рис. 8а). Сайты связывания с Ku-субъединицами располагаются в разных доменах на участках

102–210, 2178–2248 и 2374–2394 аминокислотной последовательности (а.п.). Участки 892–1289 и 1503–1538 а.п., расположенные в круговой секции, связывают ДНК [97]. Субъединицы Ku70 и Ku80 имеют схожую доменную структуру: N-концевой α/β -домен; центральный домен, состоящий из β -бочонков; и специфический C-концевой домен «рука», состоящий из спиралей (рис. 8б). N-концевой α/β -домен относится к семейству vWA (Willebrand factor A) доменов, включающих 6-цепочечные β -листы в складке Россмана, и участвует в ДНК репарации, но не принимает участие в прямом связывании ДНК, а также участвует в белок-белковых взаимодействиях. Центральный домен состоит из 7-цепочечных антипараллельных β -бочонков и участвует в связывании ДНК и гетеродимеризации. Связывание с ДНК не зависит от последовательности и имеет более высокую аффинность к дцДНК по сравнению к оцДНК. C-концевой домен участвует в узнавании ДНК и взаимодействии с DNA-PKcs и структурно различается у субъединиц Ku70 и Ku80. На C-конце субъединицы Ku70 присутствует ДНК-связывающий домен SAP (SAF-A/B, Acinus, and PIAS) (5 кДа). Предположительно этот домен стабилизирует взаимодействие Ku70 с ДНК [96] (рис. 8в). C-концевой

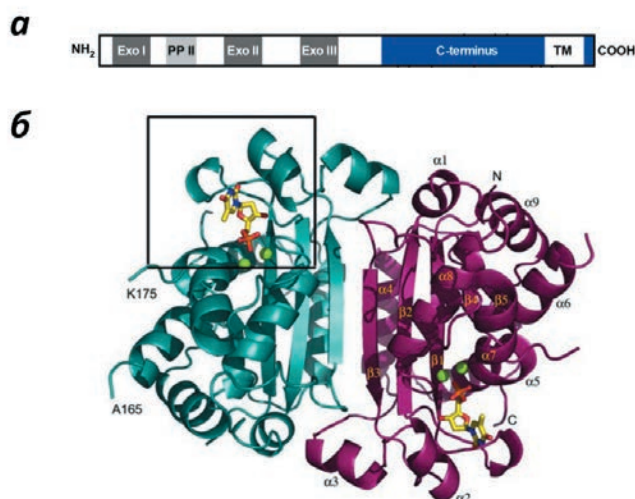


Рис. 10. Схема доменной организации TREX1 (а) и модель структуры гомодимера TREX1 (б) (адаптировано из [106, 107], используется с разрешения издательства). б — Мономеры TREX1 обозначены голубым и фиолетовым цветами. Черным квадратом выделена область активного центра, где связываются ионы магния (зеленые сферы) и нуклеотид dTMP (желто-оранжевая структура), а также происходит связывание оцДНК. В составе мономера присутствует неупорядоченная петля (166–174 а.о.), принимающая участие в связывании с дцДНК. Положение петли обозначено Ala165 и Lys175.

домен субъединицы Ku80 (CTD) (19 кДа) вовлечен во взаимодействие с DNA-ПКcs. Субъединицы Ku70 и Ku80 формируют гетеродимер, который совместно с третьей субъединицей DNA-ПКcs образуют тройной комплекс, связывающий ДНК (рис. 8г, DNA-ПКcs на рисунке не представлена). Аффинность связывания с ДНК падает в отсутствие гетеродимера Ku70/Ku80 [98].

Участие субъединиц Ku70, Ku80 и DNA-ПКcs в активации сигнального пути cGAS–STING и продукции интерферонов малоизучены. Ferguson и соавторы показали, что в цитоплазме фибробластов, являющихся первичной мишенью вирусов, наблюдается высокая базовая экспрессия белка DNA-ПК, и при проникновении чужой ДНК он выступает как PRRs, связывая ДНК, запускает транскрипцию генов интерферонов I типа, цитокинов и хемокинов с участием IRF3, TBK1 и STING [92]. Известно, что субъединица Ku70 вовлечена в процесс репарации ДНК и играет роль в связывании ДНК длиной свыше 500 п.о. и активации продукции интерферонов III типа посредством IRF1 и IRF7 [99]. При исследовании, выполненном на клетках с дефицитом STING,

было показано, что DNA-ПК реагирует на ДНК и активирует независимый от STING сигнальный путь SIDSP. У мышей с недостаточной экспрессией DNA-ПКcs наблюдаются нарушения в продукции цитокинов в условиях стимуляции вирусной ДНК, но не вирусной РНК [100]. Таким образом, какие механизмы активации cGAS–STING сигнального пути приводят к продукции провоспалительных цитокинов с участием DNA-ПК, еще предстоит выяснить.

Белок MRE-11 участвует в репарации разрывов дцДНК, гомологичной рекомбинации и поддержании длины теломеров. Данный белок обладает 3'–5' экзонуклеазной и эндонуклеазной активностью и взаимодействует с белком репарации ДНК RAD50 [101]. MRE-11 состоит из нуклеазного домена, включающего четыре высококонсервативных фосфодиэстеразных мотива, и двух ДНК-связывающих доменов: ДНК-связывающий сайт А (407–421 а.о.) с кластером положительно заряженных а.о. и ДНК-связывающий сайт В (644–692 а.о.) с кластером отрицательно-заряженных а.о (рис. 9а).

На рис. 9б представлена модель комплекса димеров RAD50 (оранжевый/желтый цвета) и MRE-11 (голубой/синий цвета) в покоем состоянии. В мономерах RAD50 показаны нуклеотид-связывающие домены (NBD) и двойные спирали (CC). В мономере MRE-11 обозначены несколько доменов: нуклеазный домен с аутоингибированными активными сайтами, кэппинг-домен, линкер и С-концевой HLH (helix-loop-helix, спираль-петля-спираль) домен, связывающий RAD50. Криоэлектронная структура показывала, что в состоянии покоя ATP–RAD50 блокирует нуклеазный домен MRE-11. В условиях связывания ДНК нуклеазный домен освобождается и образуется канал, где происходит нуклеазная реакция на концах ДНК [103] (рис. 9в).

Известно, что белок MRE-11, являясь сенсором ДНК, способен активировать STING [104]. Показано, что при мутациях в нуклеазном домене MRE-11 стимуляция клеток ДНК вызывает более сильный иммунный ответ. Это дает основание полагать, что MRE-11 может функционировать не только как сенсор ДНК, но и как регулятор, запускающий или подавляющий иммунный ответ. В свою очередь, RAD в составе комплекса RAD50–MRE-11 также может связывать CARD9, что приводит к вовлечению в сигнальный каскад Bcl-10 и активации NF-κB, а также к продукции IL-1β в ответ на связывание с ДНК [105]. Для установления детального механизма участия комплекса RAD50–MRE-11 в STING-зависимом сигнальном

пути, вызывающем продукцию цитокинов, необходимы дальнейшие исследования.

TREX1

Многие сенсоры нуклеиновых кислот расположены в цитоплазме, где появление ДНК является неблагоприятным сигналом. Так, появление в цитоплазме собственной ДНК в результате дефектов различных механизмов удаления ДНК из цитоплазмы, может вызывать активацию провоспалительных сигнальных каскадов. В устранении нуклеиновых кислот, накапливающихся в цитоплазме и вызывающих активацию сигнальных каскадов врожденного иммунитета, принимает участие экзонуклеаза TREX1 (three prime repair exonuclease 1).

Белок TREX1 относится к семейству DEDD-экзонуклеаз, имеющих в составе консервативный Asp—Glu—Asp—Asp-мотив и обладающих 3'-экзонуклеазной активностью. Белки из этого семейства удаляют лишние нуклеотиды с 3'-конца оцДНК при репликации и/или репарации. Структурно TREX1 (молекулярный вес 32 кДа, 314 а.о.) состоит из трех доменов с экзонуклеазной активностью (экзонуклеазный домен I, II, и III) и полипролинового домена (PPII), расположенных на N-конце, а также C-концевой области (80 а.о., с большим количеством Leu), включающей один трансмембранный домен, который участвует в клеточной локализации фермента в ЭПР (преимущественно в перинуклеарном пространстве) (рис. 10а). TREX1 функционирует в качестве гомодимера, причем структура сформированного димера TREX1 уникальна среди белков этого семейства и определяет его каталитическую активность [106–108] (рис. 10б). Известно, что C-конец TREX1 способен взаимодействовать с гликозилирующим комплексом (OST) и комплексом репарации ДНК (SET).

TREX1 вовлечен в иммунную регуляцию в ответ на вирусную инфекцию. При инфицировании HIV1 в клетках снижалось количество вирусной ДНК за счет работы TREX1, что предотвращало активацию STING-зависимого сигнального пути [109]. Предполагается, что TREX1 выступает в роли отрицательного регулятора врожденного иммунного ответа путем деградации aberrантной ДНК (оцДНК, ретроэлементы и др.), препятствуя ее накоплению в цитоплазме и отменяя стимуляцию STING-опосредованной продукции интерферонов I типа в иммунных и опухолевых клетках [110]. При мутациях в гене *Trex1* или подавлении экспрессии *Trex1* у мышей происходит повышение продукции интерферона и развитие серьезных аутоиммунных заболеваний (системная красная

волчанка, амиотрофический латеральный склероз и др.) [111–113].

Вопрос о том, как TREX1 способен активировать сигнальный путь cGAS—STING остается малоизученным. Возможно, между TREX1 и STING существует какое-то прямое или не прямое взаимодействие, поскольку и TREX1, и STING локализируются в ЭПР. Однако важно отметить, что TREX1 в качестве субстрата использует оцДНК, тогда как STING преимущественно активируется дцДНК. Получение животных с одновременным нокаутом TREX1 и STING поможет понять степень взаимодействия между этими белками, а также установить роль TREX в активации STING-зависимой продукции интерферонов. Несмотря на то, что механизмы участия TREX в индукции интерферона требуют более детального изучения, в настоящее время разработка ингибиторов TREX1 является одной из стратегий активации сигнальных путей, приводящих к продукции провоспалительных цитокинов. Уже был синтезирован ингибитор TREX1, CPI-381, и исследовано его влияние на активацию сигнального каскада cGAS—STING в условиях *in vitro* и противоопухолевое действие в условиях *in vivo*. CPI-381 вызывал продукцию cGAMP в клетках B16F1 после трансфекции ДНК. В клетках THP-1 наблюдалась повышенная экспрессия ключевых интерферон-стимулируемых генов. В клетках B16F10, MB49, MC38, CT26 с нокаутом TREX повышалась секреция IFN- β . У мышей с сингенной опухолью, вызванной клетками MC38, отмечалось снижение роста опухолей, как при лечении CPI-381, так и в комбинации с анти-PD1-терапией [114].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разнообразие внутриклеточных сенсоров нуклеиновых кислот, участвующих в активации cGAS—STING сигнального пути, индуцирующего иммунный ответ, открывает широкие возможности для применения агонистов или антагонистов этих сенсоров с целью повышения или снижения иммунного ответа при онкологических и других заболеваниях. Однако для использования этой стратегии в терапии рака на практике потребуются провести большое количество исследований, посвященных определению состояния молекулярно-генетического профиля cGAS—STING сигнального пути в разных типах опухолей, в связи с тем, что в некоторых типах рака (рак толстой кишки и меланома) STING-зависимый сигнальный путь подавлен из-за генетических мутаций или эпигенетической регуляции промоторов STING/cGAS, что приводит к невозможности продукции цитокинов и их участию в иммунологическом надзоре [115]. Таким

образом, для разработки STING-таргетированной терапии могут потребоваться персонализированные протоколы, учитывающие особенности cGAS–STING сигнального пути конкретных пациентов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ № 075–15–2021–1060 от 28.09.2021 г. и НИР в рамках ГЗ на выполнение государственных работ в сфере научной деятельности ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по теме: «Разработка нового класса противоопухолевых препаратов, основанных на таргетной стимуляции сигнального пути STING в злокачественных новообразованиях» (№ 123021500025–1).

Соответствие принципам этики. Для данной статьи авторами не проводились эксперименты с участием людей или животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zahid A., Ismail H., Li B., Jin T. 2020. Molecular and structural basis of DNA sensors in antiviral innate immunity. *Front Immunol.* **11**, 613039. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.613039>
- Bartok E., Hartmann G. 2020. Immune sensing mechanisms that discriminate self from altered self and foreign nucleic acids. *Immunity.* **53** (1), 54–77. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.014>
- Ablasser A., Hur S. 2020. Regulation of cGAS- and RLR-mediated immunity to nucleic acids. *Nat. Immunol.* **21**, 17–29. doi 10.1038/s41590-019-0556-1
- Jiang M., Chen P., Wang L., Li W., Chen B., Liu Y., Wang H., Zhao S., Ye L., He Y., Zhou C. 2020. cGAS-STING, an important pathway in cancer immunotherapy. *J. Hematol. Oncol.* **13**, 81. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00916-z>
- Zhou J., Zhuang Z., Li J., Feng Z. 2023. Significance of the cGAS-STING pathway in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **24** (17), 13316. <https://doi.org/10.3390/ijms241713316>
- Chen Q., Sun L., Chen Z.J. 2016. Regulation and function of the cGAS–STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat. Immunol.*, **17**, 1142–1149. <https://doi.org/10.1038/ni.3558>
- Li Q., Tian S., Liang J., Fan J., Lai J., Chen Q. 2021. Therapeutic development by targeting the cGAS-STING Pathway in autoimmune disease and cancer. *Front. Pharmacol.* **12**, 779425. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.779425>
- Zhang D., Liu Y., Zhu Y., Zhang Q., Guan H., Liu S., Chen S., Mei C., Chen C., Liao Z., Xi Y., Ouyang S., Feng X.-H., Liang T., Shen L., Xu P. 2022. A non-canonical cGAS-STING-PERK pathway facilitates the translational program critical for senescence and organ fibrosis. *Nat. Cell Biol.* **24** (5), 766–782. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00894-z>
- Sun L., Wu J., Du F., Chen X., Chen Z.J. 2013. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science.* **339**, 786–791. <https://doi.org/10.1126/science.1232458>
- Wu X., Wu F.-H., Wang X., Wang L., Siedow J.N., Zhang W., Pei Z.-M. 2014. Molecular evolutionary and structural analysis of the cytosolic DNA sensor cGAS and STING. *Nucleic Acids Res.* **42** (13), 8243–8257. <https://doi.org/10.1093/nar/gku569>
- Zhou W., Whiteley A.T., de Oliveira Mann C.C., Morehouse B.R., Nowak R.P., Fischer E.S., Gray N.S., Mekalanos J.J., Kranzusch P.J. 2018. Structure of the human cGAS-DNA complex reveals enhanced control of immune surveillance. *Cell.* **174** (2), 300–311, e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.026>
- Wang D., Zhao H., Shen Y., Chen Q. 2022. A variety of nucleic acid species are sensed by cGAS, implications for its diverse functions. *Front. Immunol.* **13**, 826880. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.826880>
- Wu J., Sun L., Chen X., Du F., Shi H., Chen C., Chen Z.J. 2013. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science.* **339** (6121), 826–830. <https://doi.org/10.1126/science.1229963>
- Herzner A.-M., Hagmann C.A., Goldeck M., Wolter S., Kübler K., Wittmann S., Gramberg T., Andreeva L., Hopfner K.-P. Mertens C., Zillinger T., Jin T., Xiao T.S., Bartok E., Coch C., Ackermann D., Hornung V., Ludwig J., Barchet W., Hartmann G., Schlee M. 2015. Sequence-specific activation of the DNA sensor cGAS by Y-form DNA structures as found in primary HIV-1 cDNA. *Nat. Immunol.* **16** (10), 1025–1033. <https://doi.org/10.1038/ni.3267>
- Gentili M., Kowal J., Tkach M., Satoh T., Lahaye X., Conrad C., Boyron M., Lombard B., Durand S., Kroemer G., Loew D., Dalod M., Théry C., Manel N. 2015. Transmission of innate immune signaling by packaging of cGAMP in viral particles. *Science.* **349** (6253), 1232–1236. <https://doi.org/10.1126/science.aab3628>
- Zhang X., Wu J., Du F., Xu H., Sun L., Chen Z., Brautigam C.A., Zhang X., Chen Z.J. 2014. The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop. *Cell Rep.* **6** (3), 421–430. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.003>
- Li X., Shu C., Yi G., Chaton C.T., Shelton C.L., Diao J., Zuo X., Kao C.C., Herr A.B., Li P. 2013. Cyclic GMP-AMP synthase is activated by double-stranded DNA-induced oligomerization. *Immunity.* **39**(6), 1019–1031. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.019>

18. Kranzusch P. J., Lee A.S.-Y., Berger J.M., Doudna J.A. 2013. Structure of human cGAS reveals a conserved family of second-messenger enzymes in innate immunity. *Cell Rep.* **3** (5), 1362–1368. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.008>
19. Huérfano S., Šroller V., Brušíková K., Horníková L., Forstová J. 2022. The interplay between viruses and host DNA sensors. *Viruses.* **14** (4), 666. <https://doi.org/10.3390/v14040666>
20. Yoh S. M., Schneider M., Seifried J., Soonthornvacharin S., Akleh R.E., Olivieri K.C., De Jesus P.D., Ruan C., de Castro E., Ruiz P.A., Germanaud D., des Portes V., García-Sastre A., König R., Chanda S.K. 2015. PQBP1 is a proximal sensor of the cGAS-dependent innate response to HIV-1. *Cell.* **161** (6), 1293–1305. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.050>
21. Seo G. J., Yang A., Tan B., Kim S., Liang Q., Choi Y., Yuan W., Feng P., Park H.-S., Jung J.U. 2015. Akt kinase-mediated checkpoint of cGAS DNA sensing pathway. *Cell Rep.* **13** (2), 440–449. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.007>
22. Xia P., Ye B., Wang S., Zhu X., Du Y., Xiong Z., Tian Y., Fan Z. 2016. Glutamylation of the DNA sensor cGAS regulates its binding and synthase activity in antiviral immunity. *Nat. Immunol.* **17** (4), 369–378. <https://doi.org/10.1038/ni.3356>
23. Jiang H., Xue X., Panda S., Kawale A., Hooy R.M., Liang F., Sohn J., Sung P., Gekara N.O. 2019. Chromatin-bound cGAS is an inhibitor of DNA repair and hence accelerates genome destabilization and cell death. *EMBO J.* **38** (21), e102718. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102718>
24. Michalski S., Mann C.C. de O., Stafford C.A., Witte G., Bartho J., Lammens K., Hornung V., Hopfner K.-P. Structural basis for sequestration and autoinhibition of cGAS by chromatin. *Nature.* **587** (7835), 678–682. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2748-0>
25. Zhou S., Su T., Cheng F., Cole J., Liu X., Zhang B., Alam S., Liu J., Zhu G. 2023. Engineering cGAS-agonistic oligonucleotides as therapeutics and vaccine adjuvants for cancer immunotherapy. *bioRxiv*, 2023.07.13.548237. <https://doi.org/10.1101/2023.07.13.548237>. Preprint
26. Ishikawa H., Barber G.N. 2008. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signaling. *Nature.* **455**, 674–678. <https://doi.org/10.1038/nature07317>
27. Hussain B., Xie Y., Jabeen U., Lu D., Yang B., Wu C., Shang G. 2022. Activation of STING based on its structural features. *Front. Immunol.* **13**, 808607. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.808607>
28. Zhang X., Shi H., Wu J., Zhang X., Sun L., Chen C., Chen Z.J. 2013. Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. *Mol. Cell.* **51**, 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.05.022>
29. Kato H., Takeuchi O., Mikamo-Satoh E., Hirai R., Kawai T., Matsushita K., Hiiragi A., Dermody T.S., Fujita T., Akira S. 2008. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med.* **205** (7), 1601–1610. <https://doi.org/10.1084/jem.20080091>
30. Shang G., Zhang C., Chen Z.J., Bai X.-C., Zhang X. 2019. Cryo-EM structures of STING reveal its mechanism of activation by cyclic GMP-AMP. *Nature.* **567**, 389–393. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0998-5>
31. Mukai K., Konno H., Akiba T., Uemura T., Waguri S., Kobayashi T., Barber G.N., Arai H., Taguchi T. 2016. Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi. *Nat. Commun.* **7**, 11932. <https://doi.org/10.1038/ncomms11932>
32. Liu S., Cai X., Wu J., Cong Q., Chen X., Li T., Du F., Ren J., Wu Y.-T., Grishin N.V., Chen Z.J. 2015. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science.* **347** (6227), eaat8657. <https://doi.org/10.1126/science.aaa2630>
33. Agalioti T., Lomvardas S., Parekh B., Yie J., Maniatis T., Thanos D. 2000. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN β promoter. *Cell.* **103** (4), 667–678. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00169-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00169-0)
34. Zhang J., Hu M.M., Wang Y.Y., Shu H.B. 2012. TRIM32 protein modulates type I interferon induction and cellular antiviral response by targeting MITA/STING protein for K63-linked ubiquitination. *J. Biol. Chem.* **287**, 28646–28655
35. Tsuchida T., Zou J., Saitoh T., Kumar H., Abe T., Matsuura Y., Kawai T., Akira S. 2010. The ubiquitin ligase TRIM56 regulates innate immune responses to intracellular double-stranded DNA. *Immunity* **33**, 765–776. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.013>
36. Zhong B., Zhang L., Lei C., Li Y., Mao A.-P., Yang Y., Wang Y.-Y., Zhang X.-L., Shu H.-B. 2009. The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA. *Immunity.* **30**, 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.01.008>
37. Wang Y., Lian Q., Yang B., Yan S., Zhou H., He L., Lin G., Lian Z., Jiang Z., Sun B. 2015. TRIM30a is a negative-feedback regulator of the intracellular DNA and DNA virus-triggered response by targeting STING. *PLoS Pathog.* **11**, e1005012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005012>
38. Ishikawa H., Barber G.N. 2008. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signaling. *Nature.* **455** (7213), 674–678. <https://doi.org/10.1038/nature07317>
39. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* **408**, 740–745

40. Abe T., Harashima A., Xia T., Konno H., Konno K., Morales A., Ahn J., Gutman D., Barber G.N. 2013. STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Mol. Cell.* **50** (1), 5–15.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.039>
41. Demaria O., Gassart A.D., Coso S., Gestermann N., Di Domizio J., Flatz L., Gaide O., Michielin O., Hwu P., Petrova T.V., Martinon F., Modlin R.L., Speiser D.E., Gilliet M. 2015. STING activation of tumor endothelial cells initiates spontaneous and therapeutic antitumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112** (50), 15408–15413.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1512832112>
42. Padovan E., Spagnoli G.C., Ferrantini M., Heberer M. 2002. IFN- α 2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8⁺ effector T cells. *J. Leukoc. Biol.* **71** (4), 669–676.
<https://doi.org/10.1189/jlb.71.4.669>
43. Glickman L. H., Kanne D.B., Kasibhatla S., Li J., Pferdekamper A.M.C., Gauthier K.S., Deng W., Desbien A.L., Katibah G.E., Leong J.J., Sung L., Metchette K., Ndubaku C., Zheng L., Cho C., Feng Y., McKenna J.M., Tallarico J.A., Bender S.L., Dubensky T.W., McWhirter S.M. 2016. STING activation in the tumor microenvironment with a synthetic human STING-activating cyclic dinucleotide leads to potent anti-tumor immunity. *Cancer Res.* **76** (14_Supplement), 1445.
<https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2016-1445>
44. Sivick K. E., Desbien A.L., Glickman L.H., Reiner G.L., Corrales L., Surh N.H., Hudson T.E., Vu U.T., Francica B.J., Banda T., Katibah G.E., Kanne D.B., Leong J.J., Metchette K., Brum J.R., Ndubaku C.O., McKenna J.M., Feng Y., Zheng L., Bender S.L., Cho C.Y., Leong M.L., van Elsas A., Dubensky Jr.T.W., McWhirter S.M. 2018. Magnitude of therapeutic STING activation determines CD8⁺ T cell-mediated anti-tumor immunity. *Cell Rep.* **25**, 3074–3085.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.047>
45. Meric-Bernstam F., Sweis R.F., Hodi F.S., Messersmith W.A., Andtbacka R.H.I., Ingham M., Lewis N., Chen X., Pelletier M., Chen X., Wu J., Dubensky T.W., McWhirter S.M., Muller T., Nitya N., Jason J.L. 2022. Phase I dose-escalation trial of MIW815 (ADU-S100), an intratumoral STING agonist, in patients with advanced/ metastatic solid tumors or lymphomas. *Clin. Cancer Res.* **28**, 677–688.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-1963>
46. Adli A. D.F., Jahanban-Esfahlan R., Seidi K., Samandari-Rad S., Zarghami N. 2018. An overview on Vademecan (DMXAA), the vascular disrupting agent. *Chem. Biol. Drug Des.* **91** (5), 996–1006.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.13166>
47. Ramanjulu J. M., Pesiridis G.S., Yang J., Concha N., Singhaus R., Zhang S.-Y., et al. 2018. Design of amido-benzimidazole STING receptor agonists with systemic activity. *Nature.* **564** (7736), 439–443.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0705-y>
48. Liu J., Huang X., Ding J. 2021. Identification of MSA-2: An oral antitumor non-nucleotide STING agonist. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 18.
<https://doi.org/10.1038/s41392-020-00459-2>
49. Jakobsen M. R., Bak R.O., Andersen A., Berg R.K., Jensen S.B., Jin T., Laustsen A., Hansen K., Ostergaard L., Fitzgerald K.A., Xiao T.S., Mikkelsen J.G., Mogensen T.H., Paludan S.R. 2013. IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110** (48), E4571–E4580.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1311669110>
50. Kerur N., Veettil M.V., Sharma-Walia N., Bottero V., Sadagopan S., Otageri P., Chandran B. 2011. IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host Microbe.* **9** (5), 363–375.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.008>
51. Fan X., Jiang J., Zhao D., Chen F., Ma H., Smith P., Unterholzner L., Xiao T.S., Jin T. 2021. Structural mechanism of DNA recognition by the p204 HIN domain. *Nucleic Acids Research*, **49** (5), 2959–2972.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab076>
52. Morrone S. R., Wang T., Constantoulakis L.M., Hooy R.M., Delannoy M.J., Sohn J. 2014. Cooperative assembly of IFI16 filaments on dsDNA provides insights into host defense strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111** (1), E62–E71.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1313577111>
53. Stratmann S. A., Morrone S.R., van Oijen A.M., Sohn J. 2015. The innate immune sensor IFI16 recognizes foreign DNA in the nucleus by scanning along the duplex. *Elife.* **4**, e11721.
<https://doi.org/10.7554/eLife.1172>
54. Ni X., Ru H., Ma F., Zhao L., Shaw N., Feng Y., Ding W., Gong W., Wang Q., Ouyang S., Cheng G., Liu Z.-J. 2016. New insights into the structural basis of DNA recognition by HINa and HINb domains of IFI16. *J. Mol. Cell Biol.* **8** (1), 51–61.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv053>
55. 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. 2010. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat. Immunol.* **11**, 997–1004.
<https://doi.org/10.1038/ni.1932>
56. Jin T., Perry A., Jiang J., Smith P., Curry J.A., Unterholzner L., Jiang Z., Horvath G., Rathinam V.A., Johnstone R.W., Hornung V., Latz E., Bowie A.G., Fitzgerald K.A., Xiao T.S. 2012. Structures of the HIN domain: DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity.* **36** (4), 561–571.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.02.014>
57. Ru H., Ni X., Zhao L., Crowley C., Ding W., Hung L.-W., Shaw N., Cheng G., Liu Z.-J. 2013. Structural basis for termination of AIM2-mediated signaling

- by p202. *Cell Res.* **23** (6), 855–858.
<https://doi.org/10.1038/cr.2013.52>
58. Buenrostro J. D., Giresi P.G., Zaba L.C., Chang H.Y., Greenleaf W.J. 2013. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat. Methods.* **10** (12), 1213–1218.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2688>
 59. Lum K. K., Howard T.R., Pan C., Cristea I.M. 2019. Charge-mediated pyrin oligomerization nucleates antiviral IFI16 sensing of herpesvirus DNA. *mBio.* **10** (4), e01428–19.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01428-19>
 60. Doitsh G., Galloway N.L.K., Geng X., Yang Z., Monroe K.M., Zepeda O., Hunt P.W., Hatano H., Sowinski S., Muñoz-Arias I., Greene W.C. 2014. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature.* **505** (7484), 509–514.
<https://doi.org/10.1038/nature12940>
 61. Jönsson K., Laustsen A., Krapp C., Skipper K., Thavachelvam K., Hotter D., Egedal J.H., Kjolby M., Mohammadi P., Prabakaran T., Sørensen L.K., Sun C., Jensen S.B., Holm C.K., Lebbink R.J., Johannsen M., Nyegaard M., Mikkelsen J.G., Kirchhoff F., Paludan S.R., Jakobsen M.R. 2017. IFI16 is required for DNA sensing in human macrophages by promoting production and function of cGAMP. *Nat. Commun.* **8**, 14391.
<https://doi.org/10.1038/ncomms14391>
 62. Rathinam V. A., Jiang Z., Waggoner S.N., Sharma S., Cole L.E., Waggoner L., Vanaja S.K., Monks B.G., Ganesan S., Latz E., Hornung V., Vogel S.N., Szomolanyi-Tsuda E., Fitzgerald K.A. 2010. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat. Immunol.* **11** (5), 395.
<https://doi.org/10.1038/ni.1864>
 63. Hauenstein A. V., Zhang L., Wu H. 2015. The hierarchical structural architecture of inflammasomes, supramolecular inflammatory machines. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **31**, 75–83.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.03.014>
 64. Sharma M., de Alba E. 2021. Structure, activation and regulation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2), 872.
<https://doi.org/10.3390/ijms22020872>
 65. Morrone S. R., Matyszewski M., Yu X., Delannoy M., Egelman E.H., Sohn J. 2015. Assembly-driven activation of the AIM2 foreign-dsDNA sensor provides a polymerization template for downstream ASC. *Nat. Commun.* **6**, 7827.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8827>
 66. Lu A., Li Y., Yin Q., Ruan J., Yu X., Egelman E., Wu H. 2015. Plasticity in PYD assembly revealed by cryo-EM structure of the PYD filament of AIM2. *Cell Discovery.* **1**, 15013.
<https://doi.org/10.1038/celldisc.2015.13>
 67. Hornung V., Ablasser A., Charrel-Dennis M., Bauernfeind F., Horvath G., Caffrey D.R., Latz E., Fitzgerald K.A. 2009. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature.* **458**, 514–518.
 68. Panchanathan R., Duan X., Shen H., Rathinam V.A.K., Erickson L.D., Fitzgerald K.A., Choubey D. 2010. Aim2 deficiency stimulates the expression of IFN-inducible Ifi202, a lupus susceptibility murine gene within the Nba2 autoimmune susceptibility locus. *J. Immunol.* **185** (12), 7385–7393.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002468>
 69. Corrales L., Woo S.-R., Williams J.B., McWhirter S.M., Dubensky Jr T.W., Gajewski T.F. 2016. Antagonism of the STING pathway via activation of the AIM2 inflammasome by intracellular DNA. *J. Immunol.* **196** (7), 3191–3198.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502538>
 70. Mayer-Barber K.D., Andrade B.B., Oland S.D., Amaral E.P., Barber D.L., Gonzales J., Derrick S.C., Shi R., Kumar N.P., Wei W., Yuan X., Zhang G., Cai Y., Babu S., Catalfamo M., Salazar A.M., Via L.E., Barry 3rd C.E., Sher A. 2014. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature.* **511** (7507), 99–103.
<https://doi.org/10.1038/nature13489>
 71. 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. 2007. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature.* **448**, 501–505.
<https://doi.org/10.1038/nature06013>
 72. Deigendesch N., Koch-Nolte F., Rothenburg S. 2006. ZBP1 subcellular localization and association with stress granules is controlled by its Z-DNA binding domains. *Nucleic Acids Res.* **34** (18), 5007–5020.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl575>
 73. Ha S. C., Quyen D.V., Hwang H.-Y., Oh D.-B., Brown 2nd B.A., Lee S.M., Park H.-J., Ahn J.-H., Kim K.K., Kim Y.-G. 2006. Biochemical characterization and preliminary X-ray crystallographic study of the domains of human ZBP1 bound to left-handed Z-DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* **1764** (2), 320–323.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.12.012>
 74. Ha S. C., Kim D., Hwang H.-Y., Rich A., Kim Y.-G., Kim K.K. 2008. The crystal structure of the second Z-DNA binding domain of human DAI (ZBP1) in complex with Z-DNA reveals an unusual binding mode to Z-DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105** (52), 20671–20676.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0810463106>
 75. Schwartz T., Behlke J., Lowenhaupt K., Heinemann U., Rich A. 2001. Structure of the DLM-1–Z-DNA complex reveals a conserved family of Z-DNA-binding proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **8**, 761–765.
 76. Athanasiadis A., Placido D., Maas S., Brown 2nd B.A., Lowenhaupt K., Rich A. 2005. The crystal structure of the Z-domain of the RNA-editing enzyme ADAR1 reveals distinct conserved surfaces among Z-domains. *J. Mol. Biol.* **351**, 496–507.

77. Schwartz T., Rould M.A., Lowenhaupt K., Herbert A., Rich A. 1999. Crystal structure of the Z-domain of the human editing enzyme ADAR1 bound to left-handed Z-DNA. *Science*. **284**, 1841–1845.
78. Wang Z., Choi M.K., Ban T., Yanai H., Negishi H., Lu Y., Tamura T., Takaoka A., Nishikura K., Taniguchi T. 2008. Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105** (14), 5477–5482. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801295105>
79. Ishii K. J., Kawagoe T., Koyama S., Matsui K., Kumar H., Kawai T., Uematsu S., Takeuchi O., Takeshita F., Coban C., Akira S. 2008. TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature*. **451** (7179), 725–729. <https://doi.org/10.1038/nature06537>
80. Lippmann J., Rothenburg S., Deigendesch N., Eitel J., Meixenberger K., van Laak V., Slevogt H., Dje N'guessan P., Hippenstiel S., Chakraborty T., Flieger A., Suttorp N., Opitz B. 2008. IFN β responses induced by intracellular bacteria or cytosolic DNA in different human cells do not require ZBP1 (DLM-1/DAI). *Cell Microbiol.* **10** (12), 2579–2588. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01232.x>
81. Pham T. H., Kwon K.M., Kim Y.-E., Kim K.K., Jin-Hyun Ahn. 2013. DNA sensing-independent inhibition of herpes simplex virus 1 replication by DAI/ZBP1. *J. Virol.* **87** (6), 3076–3086. <https://doi.org/10.1128/JVI.02860-12>
82. Rebsamen M., Heinz L.X., Meylan E., Michallet M.-C., Schroder K., Hofmann K., Vazquez J., Benedict C.A., Tschopp J. 2009. DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF- κ B. *EMBO Rep.* **10** (8), 916–922. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.109>
83. Lei Y., VanPortfliet J.J., Chen Y.-F., Bryant J.D., Li Y., Fails D., Torres-Odio S., Ragan K.B., Deng J., Mohan A., Wang B., Brahms O.N., Yates S.D., Spencer M., Tong C.W., Bosenberg M.W., West L.C., Shadel G.S., Shutt T.E., Upton J.W., Li P., West A.P. 2023. Cooperative sensing of mitochondrial DNA by ZBP1 and cGAS promotes cardiotoxicity. *Cell*. **186** (14), 3013–3032, e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.05.039>
84. Omura H., Oikawa D., Nakane T., Kato M., Ishii R., Ishitani R., Tokunaga F., Nureki O. 2016. Structural and Functional Analysis of DDX41: A bispecific immune receptor for DNA and cyclic dinucleotide. *Sci. Rep.* **6** (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep34756>
85. Jiang Y., Zhu Y., Qiu W., Liu Y.-J., Cheng G., Liu Z.-J., Ouyang S. 2017. Structural and functional analyses of human DDX41 DEAD domain. *Protein Cell*. **8** (1), 72–76. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0351-9>
86. Jiang Y., Zhu Y., Liu Z.-J., Ouyang S. 2017. The emerging roles of the DDX41 protein in immunity and diseases. *Protein Cell*. **8**(2), 83–89. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0303-4>
87. Zhang Z., Yuan B., Bao M., Lu N., Kim T., Liu Y.-J. 2011. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat. Immunol.* **12**(10), 959–965. <https://doi.org/10.1038/ni.2091>
88. Parvatiyar K., Zhang Z., Teles R.M., Ouyang S., Jiang Y., Iyer S.S., Zaver S.A., Schenk M., Zeng S., Zhong W., Liu Z.-J., Modlin R.L., Liu Y.-J., Cheng G. 2012. The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nat. Immunol.* **13**, 1155–1161.
89. Singh R. S., Vidhyasagar V., Yang S., Arna A.B., Yadav M., Aggarwal A., Aguilera A.N., Shinriki S., Bhanumathy K.K., Pandey K., Xu A., Rapin N., Bosch M., DeCoteau J., Xiang J., Vizeacoumar F.J., Zhou Y., Misra V., Matsui H., Ross S.R., Wu Y. 2022. DDX41 is required for cGAS-STING activation against DNA virus infection. *Cell Rep.* **39** (8), 110856. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110856>
90. Abe T., Harashima A., Xia T., Konno H., Konno K., Morales A., Ahn J., Gutman D., Barber G.N. 2013. STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Mol. Cell*. **50** (1), 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.039>
91. Lieber M. R., Ma Y., Pannicke U., Schwarz K. 2003. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 712–720.
92. Ferguson B. J., Mansur D.S., Peters N.E., Ren H., Smith G.L. 2012. DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. *Elife*, **1**, e00047. <https://doi.org/10.7554/eLife.00047>
93. Hartley K. O., Gell D., Smith G.C., Zhang H., Divecha N., Connelly M.A., Admon A., Lees-Miller S P., Anderson C.W., Jackson S.P. 1995. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: A relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell*. **82**, 849–856. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90482-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90482-4)
94. Sharif H., Li Y., Dong Y., Dong L., Wang W.L., Mao Y., Wu H. 2017. Cryo-EM structure of the DNA-PK holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114** (28), 7367–7372. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707386114>
95. Abbasi S., Parmar G., Kelly R.D., Balasuriya N., Schild-Poulter C. 2021. The Ku complex: Recent advances and emerging roles outside of non-homologous end-joining. *Cell Mol. Life Sci.* **78** (10), 4589–4613. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03801-1>
96. Rivera-Calzada A., Spagnolo L., Pearl L.H., Llorca O. 2007. Structural model of full-length human Ku70-Ku80 heterodimer and its recognition of DNA and DNA-PKcs. *EMBO Rep.* **8**(1), 56–62. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400847>
97. Lees-Miller J.P., Cobban A., Katsonis P., Bacolla A., Tsutakawa S.E., Hammel M., Meek K., Anderson D.W., Lichtarge O., Tainer J.A., Lees-Miller S.P. 2021. Uncovering DNA-PKcs ancient phylogeny, unique sequence

- motifs and insights for human disease. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **163**, 87–108.
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2020.09.010>
98. Yaneva M., Kowalewski T., Lieber M.R. 1997. Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: Biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J.* **16**, 5098–5112
 99. Zhang X., Brann T.W., Zhou M., Yang J., Oguariri R.M., Lidie K.B., Imamichi H., Huang D.-W., Lempicki R.A., Baseler M.W., Veenstra T.D., Young H.A., Lane H.C., Imamichi T. 2011. Cutting edge: Ku70 is a novel cytosolic DNA sensor that induces type III rather than type I IFN. *J. Immunol.* **186** (8), 4541–4545
 100. Burleigh K., Maltbaek J.H., Cambier S., Green R., Gale M., James R.C., Stetson D.B. 2020. Human DNA-PK activates a STING-independent DNA sensing pathway. *Sci. Immunol.* **5** (43), eaba4219.
<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aba4219>
 101. Yuan S.-S.F., Hou M.-F., Hsieh Y.-C., Huang C.-Y., Lee Y.-C., Chen Y.-J., Lo S. 2012. Role of MRE11 in cell proliferation, tumor invasion, and DNA repair in breast cancer. *J. Natl. Cancer Institute.* **104** (19), 1485–1502.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djs355>
 102. Williams B., Bhattacharyya M.K., Lustig A.J. 2005. Mre 11 p nuclease activity is dispensable for telomeric rapid deletion. *DNA Repair (Amst).* **4** (9), 994–1005.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.04.016>
 103. Käshammer L., Saathoff J.-H., Lammens K., Gut F., Bartho J., Alt A., Kessler B., Hopfner K.-P. 2019. Mechanism of DNA end sensing and processing by the Mre11-Rad50 complex. *Mol. Cell.* **76** (3), 382–394, e6.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.035>
 104. Kondo T., Kobayashi J., Saitoh T., Maruyama K., Ishii K.J., Barber G.N., Komatsu K., Akira S., Kawai T. 2013. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110** (8), 2969–2974.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1222694110>
 105. Roth S., Rottach A., Lotz-Havla A.S., Laux V., Muschaweckh A., Gersting S.W., Gersting S.W., Muntau A.C., Hopfner K.-P., Jin L., Vanness K., Petrini J.H.J., Drexler I., Leonhardt H., Ruland J. 2014. Rad50-CARD9 interactions link cytosolic DNA sensing to IL-1b production. *Nat. Immunol.* **15**, 538–545. <https://doi.org/10.1038/ni.2888>
 106. Macaron G., Khoury J., Hajj-Ali R.A., Prayson R.A., Srivastava S., Ehlers J.P., Mamsa H., Liszewski M.K., Jen J.C., Bermel R.A., Ontaneda D. 2021. Novel de novo TREX1 mutation in a patient with retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations mimicking demyelinating disease. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **52**, 103015.
<https://doi.org/10.1016/j.msard.2021.103015>
 107. Brucet M., Querol-Audí J., Serra M., Ramirez-Espain X., Bertlik K., Ruiz L., Lloberas J., Macias M.J., Fita I., Celada A. 2007. Structure of the dimeric exonuclease TREX1 in complex with DNA displays a proline-rich binding site for WW Domains. *J. Biol. Chem.* **282** (19), 14547–14557.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M700236200>
 108. Hemphill W. O., Simpson S.R., Liu M., Salsbury Jr F.R., Hollis T., Grayson J.M., Perrino F.W. 2021. TREX1 as a novel immunotherapeutic target. *Front. Immunol.* **12**, 660184.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.660184>
 109. Yan N., Regalado-Magdos A.D., Stiggelbout B., Lee-Kirsch M.A., Lieberman J. 2010. The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nat. Immunol.* **11**, 1005–1013.
 110. Stetson D. B., Ko J.S., Heidmann T., Medzhitov R. 2008. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell.* **134**, 587–598.
 111. Yang Y. G., Lindahl T., Barnes D.E. 2007. Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell.* **131**, 873–886.
 112. Lehtinen D. A., Harvey S., Mulcahy M.J., Hollis T., Perrino F.W. 2008. The TREX1 double-stranded DNA degradation activity is defective in dominant mutations associated with autoimmune disease. *J. Biol. Chem.* **283**, 31649–31656.
 113. O'Driscoll M. 2008. TREX1 DNA exonuclease deficiency, accumulation of single stranded DNA and complex human genetic disorders. *DNA Repair.* **7**, 997–1003.
 114. Salojin C., Gardberg A., Vivat V., Cui L., Lauer J., Cantone N., Stuckey J., Poy F., Almeciga I., Cummings R., Wilson J., Levell J., Rocnik J., Trojer P. 2021. The first-in-class small molecule TREX1 inhibitor CPI-381 demonstrates type I IFN induction and sensitization of tumors to immune checkpoint blockade. *J. Immunother. Cancer.* **9** (Suppl 2), A1–A1054.
<https://doi.org/10.1136/jitc-2021-SITC2021.76>
 115. Konno H., Yamauchi S., Berglund A., Putney R.M., Mulé J.J., Barber G.N. 2018. Suppression of STING signaling through epigenetic silencing and missense mutation impedes DNA damage mediated cytokine production. *Oncogene.* **37** (15), 2037–2051.
<https://doi.org/10.1038/s41388-017-0120-0>

Sensors of Intracellular Nucleic Acids Activating STING-Dependent Production of Interferons in Immunocompetent Cells

© 2024 г. L. V. Smolyaninova^{1, *}, O. N. Solopova¹

¹*Laboratory of Bioresource Collection of Cell Lines and Primary Tumors, Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478 Russia*

**e-mail: smolyaninovalarisa1@gmail.com*

Currently, foreign DNA or RNA sensor proteins, which play an important role in innate immunity, are of great interest as a new avenue for cancer immunotherapy. Agonists of these proteins can activate signaling cascades in immune cells that cause the production of cytokines, in particular type I interferons, which have a powerful cytotoxic effect. This review examines the functioning of cytoplasmic nucleic acid sensors such as cGAS, STING, IFI16, AIM2, DAI, DDX41, DNA-PK, MRE-11, and TREX1 involved in activating the production of various cytokines.

Keywords: DNA/RNA sensors, cytokines, interferons, cGAS, STING, immune cells