

УДК 577.27

АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ СУБЪЕДИНИЦ ИММУНОПРОТЕАСОМЫ В МОНОЦИТАХ МЫШЕЙ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ РАЗЛИЧНЫМИ ШТАММАМИ МИКОБАКТЕРИЙ

© 2013 г. А. В. Тимофеев, Ю. В. Кузьменко*, И. И. Жаркова,
Е. С. Стародубова, В. Л. Карпов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию 12.10.2012 г.

Принята к печати 29.10.2012 г.

Процессинг антигенов микобактерий туберкулеза иммунопротеасомой необходим для контроля инфекции и предотвращения развития активной формы туберкулеза. Изучена активация транскрипции генов субъединиц иммунопротеасомы при заражении перитонеальных моноцитов мышей линии C57Bl/6 вакцинным, *Mycobacterium bovis* BCG, и вирулентным, *M. tuberculosis* H37Rv, штаммами микобактерий. Обнаружено, что при однократном инфицировании моноцитов микобактериями уровень транскрипции генов субъединиц LMP2, LMP7, MECL1 иммунопротеасомы не повышается как на первый, так и на второй день после заражения. Двукратное инфицирование моноцитов *M. bovis* BCG приводило к усилению транскрипции только гена субъединицы LMP7. Однако при инфицировании моноцитов сначала вакцинным, а затем вирулентным штаммами транскрипция генов всех субъединиц иммунопротеасомы многократно возрастала. Транскрипция гена субъединицы PA28 α регуляторного комплекса PA28 протеасомы повышалась только при однократном инфицировании моноцитов штаммом *M. bovis* BCG. Таким образом, вакцинация штаммом *M. bovis* BCG способствует активации генов иммунопротеасомы при последующей встрече с вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv.

Ключевые слова: иммунопротеасома, *Mycobacterium bovis* (BCG), *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv), перитонеальные макрофаги.

ACTIVATION OF IMMUNOPROTEASOME SUBUNIT GENES TRANSCRIPTION IN MICE MONOCYTES INFECTED WITH DIFFERENT STRAINS OF MYCOBACTERIA, by A. V. Timofeev, Y. V. Kuzmenko*, I. I. Zharkova, E. S. Starodubova, V. L. Karpov (Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; *e-mail: Kuzmenko-yulia@mail.ru). Immunoproteasomal processing of mycobacterial antigens is necessary to control the infection and to protect the organism from development of active form of tuberculosis. Here we investigate the activation of immunoproteasome subunit genes transcription in peritoneal monocytes of C57Bl/6 mice infected with vaccine *M. bovis* BCG and virulent strain *M. tuberculosis* H37Rv. The level of transcription of LMP2, LMP7, MECL1 subunits didn't increase for one and two days after a single infection. Two rounds of infection with BCG strain *M. bovis* led to enhancement of the only LMP7 subunit gene transcription. However after subsequent infection of monocytes with vaccine followed by virulent strain infection the dramatic rise of all immunoproteasomal subunit genes transcription was observed. Activation of transcription of the gene coding the PA28 α subunit of regulatory complex PA28 was observed only after a single infection of monocytes with strain *M. bovis* BCG. Thus, vaccination with strain *M. bovis* BCG promotes effective activation of immunoproteasomal genes in case of subsequent contact with virulent strain *M. tuberculosis* H37Rv.

Keywords: immunoproteasome, *Mycobacterium bovis* (BCG), *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv), mice monocytes.

DOI: 10.7868/S0026898413020158

От туберкулеза, инфекционного заболевания, вызываемого *Mycobacterium tuberculosis*, ежегодно умирают более 1.5 млн. человек [1]. На

сегодняшний день единственным средством, способным эффективно защитить население от туберкулеза легких, остается вакцина Кальмет-

Принятые сокращения: МНС – главный комплекс гистосовместимости; ИФН- γ – интерферон- γ ; ФНО- α – фактор некроза опухолей- α .

* Эл. почта: Kuzmenko-yulia@mail.ru

та—Герена (BCG), созданная на основе ослабленного штамма *M. bovis* [2].

Большинство микобактерий, попавших в организм, задерживается в верхних дыхательных путях и удаляется мерцательным эпителием. Некоторые микобактерии достигают альвеол, где захватываются макрофагами [3, 4]. Известно, что микобактерии персистируют преимущественно в макрофагах [3], где они и реплицируются. При воздействии интерферона- γ (ИФН- γ) и фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) в клетке индуцируется иммунопротеасома, в которой более эффективно образуются пептиды для представления их в составе МНС класса I. Под действием этих цитокинов конститутивные β -субъединицы протеасомы заменяются их изоформами (LMP2, LMP7, MECL1). Кроме того, регуляторный активирующий комплекс 19S конститутивной протеасомы заменяется комплексом PA28 иммунопротеасомы [5–7]. Для представления белков микобактерий в комплексе с молекулами МНС-I необходима деградация антигенов при помощи субъединиц иммунопротеасомы с последующим переносом пептидных фрагментов ТАР-белками [8, 9]. Установлено, что активация субъединиц иммунопротеасомы важна для контроля инфекции и предотвращения развития активной формы туберкулеза [10].

Ранее показали, что в перитонеальных моноцитах мышей линии C57Bl/6 при их инфицировании вакцинным штаммом *M. bovis* BCG и особенно вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv индуцируются ИФН- γ и ФНО- α [11]. Однако данные об активации генов иммунопротеасомы при инфицировании перитонеальных моноцитов различными штаммами микобактерий отсутствовали. В представленной работе методом ОТ-ПЦР в реальном времени (ПЦР в реальном времени, сопряженная с обратной транскрипцией) анализировали активацию транскрипции генов субъединиц иммунопротеасомы при заражении перитонеальных моноцитов мышей вакцинным и/или вирулентным штаммами микобактерий. Оказалось, что транскрипция генов всех субъединиц многократно увеличивается только при последовательном инфицировании моноцитов сначала *M. bovis* BCG, а затем *M. tuberculosis* H37Rv. Таким образом, можно предположить, что первичное воздействие вакцинного штамма необходимо для

активации транскрипции генов субъединиц иммунопротеасомы при вторичном заражении клеток вирулентным штаммом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение и инфицирование перитонеальных моноцитов мыши. Получение перитонеальных моноцитов мыши, условия их инфицирования штаммами *M. bovis* BCG и *M. tuberculosis* H37Rv и инкубации со штаммом *Escherichia coli* описано ранее [11]. Моноциты инфицировали однократно или двукратно с интервалом 24 ч. После однократного заражения клетки инкубировали в течение 1–2 сут, а после двукратного — 1 сут. Затем клетки собирали и выделяли РНК.

Выделение РНК из моноцитов мышей. Моноциты суспендировали в ледяном 4 М растворе гуанидинизотиоцианата (“Sigma”). РНК получали при помощи специального набора для выделения РНК из тканей, инфицированных микобактериями (“ДНК-технология”), в соответствии с рекомендациями фирмы. Чистоту образцов контролировали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле (“Sigma”). Образцы хранили при -70°C .

ОТ-ПЦР в реальном времени. На первом этапе проводили реакцию обратной транскрипции. Для синтеза первой цепи кДНК в реакцию вносили 10 мкл очищенной РНК и 0.5 мкг праймера олиго(dT)18. Полученную смесь инкубировали в течение 5 мин при 70°C , а затем помещали на лед. К образцам добавляли 4 мкл 5 \times ОТ-буфера (10 мМ Трис-НСl, рН 8.3, 50 мМ КCl), 2 мкл 10 мМ смеси dNTP, содержащей по 10 мМ каждого dNTP (“СибЭнзим”), 1 мкл ингибитора рибонуклеазы и инкубировали в течение 5 мин при 37°C . Затем вносили 1 мкл (200 ед. акт.) обратной транскриптазы вируса лейкоза мышей (“Fermentas”) и инкубировали в течение 1 ч при 42°C . Реакцию останавливали прогреванием образца в течение 10 мин при 70°C .

На втором этапе проводили ПЦР в реальном времени с полученной кДНК. Для определения количества транскриптов генов субъединиц иммунопротеасомы использовали праймеры (“СибЭнзим”) и флуоресцентно меченные олигонуклеотиды (“Амплик”):

LMP2: прямой праймер — 5'-GGATGAACAAAGTGATCGAGATTAAC-3'

обратный праймер — 5'-GATAATACAACCCTGCACTCCTTGG-3'

метка — 5'-FAM-TCGGCTGCACAACCAGACATGGT-BHQ1;

LMP7: прямой праймер — 5'-GTTTCACCACAGATGCCATCAC-3'

обратный праймер — 5'-CCCAGGATGACTCGATGGTC-3'

метка — 5'-FAM-CCCAGGATGACTCGATGGTC-BHQ1-3';

MECL1: прямой праймер – 5'-CGAGCCTGTGCAGAGAGCT-3'

обратный праймер – 5'-CACAGTTTCCTCAAGAAGTTCCA-3'

метка – 5'-FAM-CTGGAACCACACCTGTCCTGACCC-BHQ1-3';

PA28 α : прямой праймер – 5'-TGAGCAATCTGAAGGCTCCAT-3'

обратный праймер – 5'-GTCTTCGTCCCCTTTCTTCTTCT-3'

метка – 5'-FAM-ACATCCCAGTACCCGATCCAGTCAAA-BHQ2-3'.

ПЦР в реальном времени проводили в 100 мкл смеси, содержащей по 50 пмоль праймеров и метки, 2.5 мкл 10 \times буфера для ПЦР (10 мМ Трис-НСl, рН 8.3, 50 мМ КCl, 1.5 мМ MgCl₂), 0.5 мкл 10 мМ смеси dNTP, 5 мкл кДНК, 1 ед. акт. (0.5 мкл) *Taq*-полимеразы ("Fermentas"). Проводили 55 циклов амплификации с параметрами: денатурация – 94 $^{\circ}$ C, 15 мин; отжиг – 60 $^{\circ}$ C, 1 мин. В качестве внутреннего стандарта использовали ген *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа), количество транскриптов которого определяли с применением набора "SYBR Green" ("Applied Biosystems"). Относительное количество транскриптов всех генов подсчитывали по формуле $N_1/N_2 = 2^{n_2 - n_1}$, где N_1 – абсолютное количество транскриптов исследуемого гена; N_2 – абсолютное количество транскриптов гена *GAPDH*; n_1 и n_2 – пороговые значения числа циклов для исследуемого гена и гена *GAPDH* соответственно. Из трех независимых экспериментов получены средние значения количества транскриптов генов и указаны средние квадратичные отклонения. Затем рассчитывали отношение количества транскриптов генов субъединиц иммунопротеасомы в моноцитах, инфицированных микобактериями туберкулеза, к количеству транскриптов в неинфицированных клетках.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

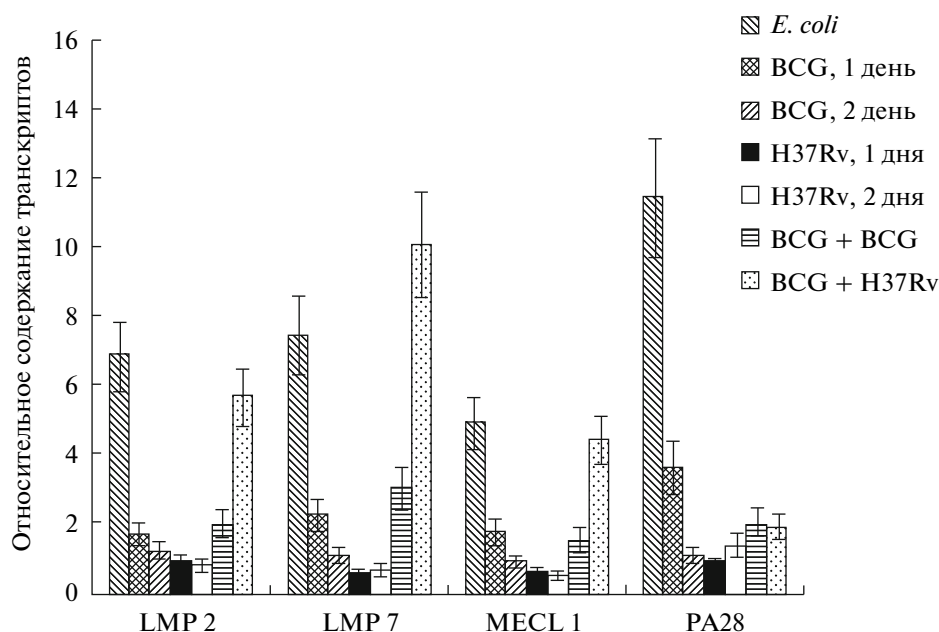
Перитонеальные моноциты мышей инфицировали вакцинным штаммом *M. bovis* BCG или вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv по следующей схеме: 1) однократное инфицирование *M. bovis* BCG или *M. tuberculosis* H37Rv; 2) двукратное инфицирование каждым из этих штаммов с промежутком 24 ч между заражениями; 3) последовательное инфицирование моноцитов штаммами *M. bovis* BCG и *M. tuberculosis* H37Rv. Положительным контролем служили моноциты, инкубированные с клетками *E. coli*, отрицательным – неинфицированные клетки. Далее через определенные промежутки времени после инфицирования моноциты собирали и выделяли из них РНК. Каждый образец РНК анализировали при помощи ПЦР в реальном времени, определяли относительные количества транскриптов генов субъединиц LMP2, LMP7, MECL1 и PA28 α в инфицированных перитонеальных моноцитах мыши (рисунок).

При инкубации моноцитов с клетками *E. coli* наблюдали значительное увеличение количества транскриптов генов субъединиц LMP2, LMP7, MECL1 и субъединицы PA28 α активатора PA28 протеасомы. Инфицирование моноцитов вакцинным штаммом *M. bovis* BCG не приводило к усилению транскрипции генов субъединиц LMP2, LMP7, MECL1 через 1 сут после заражения, тогда как количество транскриптов генов субъединицы PA28 α в 2 раза превышало количество транскриптов остальных субъединиц. В моноцитах, инфицированных вакцинным штаммом *M. bovis* BCG, через 2 сут после однократного заражения уровень транскрипции генов субъединиц LMP2, LMP7, MECL1 и PA28 α был в 2 раза ниже, чем в первый день. При инфицировании моноцитов вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv уровень транскриптов всех трех субъединиц и субъединицы PA28 α был низким как через один, так и через два дня после заражения.

При повторном инфицировании штаммом *M. bovis* BCG моноцитов, уже инфицированных этим штаммом (рисунок, BCG + BCG), усиливалась транскрипция только гена субъединицы LMP7. Транскрипция генов остальных субъединиц оставалась на низком уровне. При инфицировании моноцитов вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv после вакцинного штамма *M. bovis* BCG (рисунок, BCG + H37Rv) число транскриптов субъединиц LMP2, LMP7 и MECL1 многократно увеличивалось. При этом уровень транскрипции генов субъединиц LMP2 и MECL1 был сравним с их уровнем, наблюдаемым при инкубации с клетками *E. coli*, а у субъединицы LMP7 этот показатель был даже в 1.6 раза выше. Уровень транскрипции гена субъединицы PA28 α регуляторного комплекса PA28 протеасомы оставался низким.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Часть микобактерий, попавших в организм человека, элиминируется мукоцилиарной системой. Нарушение этого процесса приводит к проникновению микобактерий в бронхиолы и альвеолы, где они захватываются макрофагами. Макрофаги представляют бактериальные антигены Т-клеткам в составе комплекса с молекулами МНС-I и МНС-II. В ответ на попадание микобактерий Т-клетки секретируют ИФН- γ ,



Относительное содержание транскриптов генов субъединиц LMP2, LMP7, MECL1 и субъединицы PA28 α активатора PA28 протеасомы при инфицировании моноцитов мыши штаммами *M. bovis* BCG и *M. tuberculosis* H37Rv.

необходимый для активации инфицированных макрофагов и стимуляции антимикробных функций [12–15]. ИФН- γ индуцирует образование иммунопротеасом. В клетке синтезируются новые субъединицы протеасомы: β 1i (LMP2), β 2i (MECL1) и β 5i (LMP7) [16, 17]. Под действием ИФН- γ помимо субъединиц корового комплекса образуется регуляторный активирующий белок-антиген иммунопротеасомой образуются длинные олигопептиды, которые содержат на С-конце гидрофобный или положительно заряженный аминокислотный остаток, необходимый для встраивания эпитопа в щель Бьоркмана молекул МНС-I. В результате повышается эффективность представления эпитопов [20] на поверхности клетки и формируется цитотоксический ответ [5–7, 21, 22].

Механизм, лежащий в основе презентации антигенов микобактерий туберкулеза в составе комплекса с молекулами МНС-I, остается неясным до сих пор. Известно, что антигены микобактерий подвергаются многоступенчатому процессингу [23, 24] и деградации в протеасоме с последующим переносом ТАР-белками [9, 10]. Установлено также, что представление антигенов по пути МНС-I имеет важное значение для контроля микобактериальной инфекции и предупреждения развития активной формы туберкулеза [10].

Ранее мы оценили способность перитонеальных моноцитов мышей линии C57Bl/6 продуцировать цитокины в ответ на воздействие вакцинного *M. bovis* BCG и вирулентного *M. tuberculosis*

H37Rv штаммов в различных комбинациях [11]. Оказалось, что инфицирование макрофагов вакцинным и вирулентным штаммами микобактерий по-разному влияет на продукцию ИФН- γ и ФНО- α . Инфицирование макрофагов штаммом *M. bovis* BCG существенно влияло на уровень ФНО- α , что приводило к апоптозу макрофагов. Усиление апоптоза инфицированных макрофагов можно рассматривать как защитный механизм, вовлеченный в борьбу с внутриклеточной инфекцией [25]. Высокий уровень ИФН- γ наблюдали при инфицировании перитонеальных моноцитов вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. Важно отметить, что в макрофагах, зараженных вакцинным штаммом, после их повторного инфицирования значительно усиливалась продукция ИФН- γ [11].

В представленной работе изучена активация транскрипции генов субъединиц иммунопротеасомы в перитонеальных моноцитах мышей, инфицированных вакцинным *M. bovis* BCG и вирулентным *M. tuberculosis* H37Rv штаммами микобактерий. Известно, что неинфицированные моноциты содержат минимальное количество транскриптов генов субъединиц иммунопротеасомы [26]. Из перитонеальных моноцитов мышей, инфицированных микобактериями в различных комбинациях, выделяли РНК и методом ПЦР в реальном времени определяли относительные количества транскриптов генов субъединиц LMP2, LMP7, MECL1, а также субъединицы PA28 α активатора PA28 протеасомы. Обнаружено, что при однократном заражении вакцинным штаммом в моноцитах значительно

усиливается транскрипция только генов субъединицы PA28 α регуляторного комплекса PA28. При инкубации моноцитов с этим штаммом в течение 2 сут уровень транскрипции генов субъединиц LMP2, LMP7, MECL1 оставался таким же, как и после инкубации в течение 1 сут, тогда как транскрипция гена субъединицы PA28 α снижалась в 2 раза. При инфицировании моноцитов вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv уровень транскрипции генов всех субъединиц иммунопротеасомы был низким как через одни, так и через двое суток после заражения. Таким образом, однократное инфицирование каким-либо из двух штаммов микобактерий оказывается недостаточным для эффективной активации субъединиц иммунопротеасомы.

Двукратное инфицирование моноцитов штаммом *M. bovis* BCG приводило к незначительному увеличению транскрипции только гена субъединицы LMP7. Транскрипция генов остальных субъединиц оставалась на низком уровне. Только в случае, когда моноциты заражали сначала вакцинным *M. bovis* BCG, а затем вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv уровень транскрипции всех трех субъединиц иммунопротеасомы многократно повышался. При этом уровень транскрипции генов субъединиц LMP2 и MECL1 был сравним с уровнем, наблюдаемым при инкубации с клетками *E. coli*. Для субъединицы LMP7 этот показатель в 1.6 раза превысил значение, полученное при действии бактериального штамма. Уровень транскрипции гена субъединицы PA28 α был низким и сравнимым с уровнем, наблюдаемым при двукратном инфицировании вакцинным штаммом. Таким образом, гены субъединиц иммунопротеасомы активируются по-разному в зависимости от штамма микобактерий. Так, может активироваться только транскрипция гена субъединицы LMP7 или генов всех трех иммунных субъединиц, причем характер активации транскрипции гена субъединицы LMP7 отличается от характера транскрипции генов субъединиц LMP2 и MECL1. Это согласуется с данными о независимом встраивании субъединицы LMP7 в протеасому [27, 28].

Активация субъединиц иммунопротеасомы играет важную роль в контроле микобактериальной инфекции [10]. В результате наших экспериментов показано, что транскрипция генов всех субъединиц иммунопротеасомы многократно усиливалась только после последовательного инфицирования моноцитов – сначала *M. bovis* BCG, а затем *M. tuberculosis* H37Rv. В моноцитах, не инфицированных сначала вакцинным штаммом, транскрипция генов субъединиц иммунопротеасомного комплекса не активировалась. Следовательно, первоначальное воздействие штамма *M. bovis* BCG необходимо для эффективной активации субъединиц иммунопротеасомы при повторном инфици-

ровании моноцитов вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. Таким образом, предварительная подготовка иммунной системы в виде вакцинации штаммом *M. bovis* BCG крайне важна для развития клеточного иммунного ответа при последующей встрече организма с вирулентным штаммом. Следовательно, изучение механизмов активации компонентов иммунной системы необходимо для улучшения существующих и создания новых вакцин и схем вакцинации.

Авторы выражают глубокую благодарность Л.Н. Черноусовой, Т.Г. Смирновой и В.В. Сосунову (ЦНИИ Институт туберкулеза РАМН) за предоставленную возможность выполнения данной работы и помощь в ее осуществлении.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-01569а) и программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dye C. 2006. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet*. **367**, 938–940.
2. Colditz G.A., Brever T.F., Berkey C.S., Wilson M.E., Burdick E., Fineberg H.V., Mosteller F. 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA*. **271**, 698–702.
3. Fenton M.J. 1998. Macrophages and tuberculosis. *Curr. Opin. Hematol.* **5**, 72–78.
4. McDonough K. A., Kress Y., Bloom B. R. 1993. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect. Immun.* **61**, 2763–2773.
5. Preckel T., Fung-Leung W.P., Cai Z., Vitiello A., Salter-Cid L., Winqvist O., Wolfe T. G., Von Herrath M., Angulo A., Ghazal P., Lee J. D., Fourie A. M., Wu Y., Pang J., Ngo K., Peterson P.A., Früh K., Yang Y. 1999. Impaired immunoproteasome assembly and immune response in PA28K/K mice. *Science*. **286**, 2162–2165.
6. Rechsteiner M., Realini C., Ustrell V. 2000. The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem. J.* **345**, 1–15.
7. Schwarz K., Eggers M., Soza A. 2000. The proteasome regulator PAa/b can enhance antigen presentation without affecting 20S proteasome subunit composition. *Eur. J. Immunol.* **30**, 3672–3679.
8. Lewinsohn D.M., Grotzke J.E., Heinzel A.S., Zhu L., Owendale P.J., Johnson M., Alderson M.R. 2006. Secreted proteins from *Mycobacterium tuberculosis* gain access to the cytosolic MHC class-I antigen-processing pathway. *J. Immunol.* **177**, 437–42.
9. Grotzke J.E., Harriff M.J., Siler A.C., Nolt D., Delepine J., Lewinsohn D.A., Lewinsohn D.M. 2009. The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome is a HLA-I processing competent organelle. *PLoS Pathog.* **5**, 1000374.
10. Wang D., Zhou Y., Ji L., He T., Lin F., Lin R., Lin T., Mo Y. 2012. Association of LMP/TAP gene polymor-

- phisms with tuberculosis susceptibility in Li population in China. *PLoS One*. **7**, 33051.
11. Черноусова Л.Н., Тимофеев А.В., Смирнова Т.Г., Карпов В.Л., Афанасьева Е.Г. 2007. *Ex vivo* продукция интерферона-гамма, фактора некроза опухоли-альфа и интерлейкина-6 мышинными макрофагами в процессе инфекции *M. bovis* и *M. tuberculosis* H37Rv. *Бюлл. эксп. биол. мед.* **144**, 552–555.
 12. Flynn J.L., Chan J., Triebold K.J., Dalton D.K., Stewart T.A., Bloom B.R. 1993. An essential role for interferon γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med.* **178**, 2249–2254.
 13. Dalton D.K., Pitts-Meek S., Keshav S., Figari I.S., Bradley A., Stewart T.A. 1993. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon gamma genes. *Science*. **259**, 1739–1742.
 14. Cooper A.M., Dalton D.K., Stewart T.A., Griffin J.P., Russell D.G., Orme I.M. 1993. Disseminated tuberculosis in interferon γ gene-disrupted mice. *J. Exp. Med.* **178**, 2243–2247.
 15. Banaiee N., Kincaid E.Z., Buchwald U., Jacobs W.R. Jr., Ernst J.D. 2006. Potent inhibition of macrophage responses to IFN- γ by live virulent *Mycobacterium tuberculosis* is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2. *J. Immunol.* **176**, 3019–3027.
 16. Ortiz-Navarrete V., Seelig A., Gernold M., Frentzel S., Kloetzel P.M., Hammerling G.J. 1991. Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature*. **353**, 662–664.
 17. Yang Y., Waters J.B., Fruh K., Peterson P.A. 1992. Proteasomes are regulated by interferon gamma: implications for antigen processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**, 4928–4932.
 18. Dubiel W., Pratt G., Ferrell K., Rechsteiner M. 1994. Purification of a 11S regulator of the multicatalytic proteinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 22369–22377.
 19. Ma C.P., Slaughter C.A., DeMartino G.N. 1992. Identification, purification and characterisation of a protein activator (PA28) of the 20S proteasome (macropain). *J. Biol. Chem.* **267**, 10515–10523.
 20. van den Eynde B.J., Morel S. 2001. Different processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and immunoproteasome. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 147–153.
 21. Hendil K.B., Khan S., Tanaka K. 1998. Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20S proteasomes. *Biochem. J.* **332**, 749–754.
 22. Шарова Н.П. 2006. Иммунные протеасомы и иммунитет. *Онтогенез*. **37**, 171–178.
 23. Neyrolles O., Gould K., Gares M.P., Brett S., Janssen R., O'Gaora P., Herrmann J.L., Prévost M.C., Perret E., Thole J.E., Young D. 2001. Lipoprotein access to MHC class I presentation during infection of murine macrophages with live mycobacteria. *J. Immunol.* **166**, 447–457.
 24. Schaible U.E., Winau F., Sieling P.A., Fischer K., Collins H.L., Hagens K., Modlin R.L., Brinkmann V., Kaufmann S.H. 2003. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat. Med.* **9**, 1039–1046.
 25. Molloy A., Laochumroonvorapong P., Kaplan G. 1994. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus. *J. Exp. Med.* **180**, 1499–1509.
 26. Flesch I.E., Hess J.H., Huang S., Aguet M., Rothe J., Bluethmann H., Kaufmann S.H. 1995. Early IL-12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on IF and TNF. *J. Exp. Med.* **181**, 1615–1621.
 27. Groettrup M., Standera S., Stohwasser R., Kloetzel P.-M. 1997. The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 8970–8975.
 28. Griffin T.A., Nandi D., Cruz M., Fehling H.J., van Kaer L., Monaco J.J., Colbert A. 1998. Immunoproteasome assembly. Cooperative incorporation of interferon γ (IFN γ)-inducible subunits. *J. Exp. Med.* **187**, 97–104.