

БИОХИМИЯ

УДК 57.042

**АНТИ-HER2-ФОТОТОКСИН НА ОСНОВЕ ФЛАВОПРОТЕИДА miniSOG
ВЫЗЫВАЕТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС
И НЕКРОЗ HER2-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ РАКОВЫХ КЛЕТОК****О.Н. Шилова¹, Г.М. Прошкина^{1,*}, А.В. Рябова², С.М. Деев^{1,3}**¹ *Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН;
Россия, 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;*² *Институт общей физики имени А.М. Прохорова, РАН,
Россия, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 38;*³ *кафедра иммунологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12*

* e-mail: gmb@ibch.ru

Разработка и функциональная характеристика новых высокоаффинных белковых соединений, способных селективно уничтожать раковые клетки человека, является актуальной задачей современных биомедицинских исследований. В работе изучена цитотоксичность рекомбинантного фототоксичного белка DARPIn-miniSOG в отношении HER2-положительных клеток аденокарциномы молочной железы человека. Установлено, что адресный фототоксин DARPIn-miniSOG специфически взаимодействует с рецептором HER2 и вызывает фотоиндуцированную гибель HER2-положительных клеток по механизму некроза. Облучение клеток в присутствии аскорбиновой кислоты элиминирует фотоиндуцированную цитотоксичность DARPIn-miniSOG, что доказывает прооксидантный механизм действия фототоксина.

Ключевые слова: адресный фототоксин, рецептор HER2, гипоплоидная ДНК, окислительный стресс.

Рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (HER2, Human epidermal growth factor receptor-2) — тирозинкиназный рецептор, в норме присутствующий на всех типах эпителиальных тканей человека с плотностью несколько тысяч молекул на клетку. При злокачественной трансформации клетки происходит амплификация гена *HER2*, приводящая к суперэкспрессии кодируемого им рецептора. При этом концентрация HER2 на поверхности раковой клетки резко возрастает — до нескольких миллионов молекул на клетку. Известно, что 15–20% опухолей молочной железы человека характеризуется суперпродукцией онкомаркера HER2 [1, 2]. Именно поэтому онкомаркер HER2 является важной мишенью в диагностике и терапии онкозаболеваний. Иммунотерапия с применением адресных анти-HER2-антител, таких как Трастузумаб и Пертузумаб, широко используется в современной медицинской практике для лечения HER2-положительных опухолей молочной железы.

Несколько лет назад в лаборатории проф. А. Плюктуна был разработан новый класс адресных молекул неиммуноглобулиновой природы на основе искусственных белков с анкириновыми повторами — DARPins (Designed Ankyrin Repeat Proteins) [3]. DARPins отличаются высоким уровнем

экспрессии в бактериальной системе, термодинамически стабильны и являются мономерами в растворе. Кроме того, этот новый класс белковых молекул характеризуется высокой устойчивостью к протеазам [4–6].

В работе в качестве адресного модуля мы использовали DARPIn_9-29, узнающий рецептор HER2 с высокой аффинностью ($K_D = 3,8$ нМ) [7], в качестве цитотоксического модуля — фототоксичный флавопротеид miniSOG [8]. miniSOG сконструирован на основе фототропина 2 *Arabidopsis thaliana* и содержит флавинмононуклеотид (ФМН) в качестве кофактора. Благодаря наличию ФМН в своей структуре, miniSOG способен генерировать активные формы кислорода под действием синего света.

Результаты работы доказывают, что фототоксин DARPIn-miniSOG обладает специфической фотоиндуцированной цитотоксичностью в отношении HER2-положительных раковых клеток (IC_{50} 800 нМ), вызывая некроз облученных клеток. Присутствие антиоксиданта снижает токсичность фотосенсибилизатора DARPIn-miniSOG для клеток SK-BR-3, что подтверждает механизм действия белка, связанный с индукцией окислительного стресса.

Материалы и методы

Клеточные линии и условия культивирования.

Культивируемые клетки аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, гиперэкспрессирующие рецептор HER2, и клетки яичников китайского хомячка CHO выращивали в среде McCoy's 5A (Life technologies, США) с 10%-ной эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота ("HyClone", Бельгия) в атмосфере 5% CO₂ при 37°C.

Получение белка DARPIn-miniSOG. Получение плазмиды pDARP-mSOG и выделение белка DARPIn-miniSOG описано в работе [9]. Коротко, кодирующую последовательность адресного модуля DARPIn-9_29 амплифицировали с плазмиды pCG-Hnse-DARPIn-d18-9-29 (любезно предоставлена проф. А. Плюктуном, Университет Цюриха). ПЦР-фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NdeI* и *HindIII* и лигировали с вектором pET22b, предварительно обработанным этими же рестриктазами. Кодирующую последовательность цитотоксического модуля miniSOG амплифицировали с плазмиды pSD-4D5scFv-miniSOG [8], обрабатывали рестриктазами *HindIII* и *XhoI* и клонировали в вектор pET22b в одну рамку считывания с кодирующей последовательностью DARPIn-9_29. В результате экспрессионная кассета содержала индуцибельный промотор фага T7, кодирующие последовательности DARPIn-9_29, miniSOG и гексагистидиновой метки.

Экспрессию целевого белка DARPIn-miniSOG проводили в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3), индукцию осуществляли 1 mM IPTG при достижении культурой оптической плотности OD₆₀₀ 0,5–0,7. После индукции биомассу растили при 25°C в течение 8 ч. Белок DARPIn-miniSOG выделяли из растворимой фракции с использованием металло-аффинной хроматографии согласно протоколу производителя.

Проточная цитофлуориметрия. Попыты по проточной цитофлуориметрии выполняли на проточном цитометре BD Accuri C6 (Becton Dickinson, США). Адгезивные клетки снимали с подложки раствором версена (ПанЭко, Россия) и промывали фосфатно-солевым буфером (PBS, ПанЭко, Россия). Для определения субпопуляций живых и мертвых клеток в образце пробу инкубировали в 100 мкл PBS с йодидом пропидия (конечная концентрация 2,5 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США) в темноте на льду в течение 5 мин. При измерении последовательно выделяли популяции одиночных клеток, затем живых клеток (неокрашенных йодидом пропидия). При выполнении опыта использовали следующие параметры: напряжение на лазере 20 мВт и фильтр детекции 585/40 (FL2 канал) для измерения флуоресценции йодида пропидия. Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения BD Accuri C6.

Оценка цитотоксического действия фототоксина *in vitro*. Цитотоксичность генетически кодируемого адресного фотосенсибилизатора опреде-

ляли с помощью МТТ-теста [10]. Клетки SK-BR-3 в количестве 35000 клеток/мл среды и CHO в количестве 20000 клеток/мл среды рассеивали в 96-луночный планшет в объеме 200 мкл суспензии в лунку и культивировали в течение ночи. Затем среду удаляли, клетки промывали PBS и в лунки добавляли по 100 мкл PBS (отрицательный контроль) или PBS, содержащего DARPIn-miniSOG в концентрациях от 125 нМ до 3 мкМ. Планшет помещали на термостатируемую платформу и облучали в течение 20 мин светом с длиной волны 460 нм интенсивностью 55 мВт/см² при температуре 37°C. После завершения облучения в лунки добавляли питательную среду с 10% сыворотки и инкубировали 48 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Затем среду удаляли и в лунки вносили по 100 мкл раствора бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ, ПанЭко) (0,5 мг/мл), приготовленного на среде McCoy's 5A, и инкубировали 1 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. После этого раствор МТТ удаляли и к содержимому лунок добавляли по 100 мкл ДМСО, планшет встряхивали на шейкере до полного растворения кристаллов формазана. Измерение оптического поглощения содержимого каждой лунки проводили на планшетном спектрофотометре Infinite M1000 (Tecan, Швейцария) на двух длинах волн: 570 нм (рабочая) и 650 нм (сравнение). Эксперименты были выполнены в трех повторностях. Выживание клеток после инкубации с DARPIn-miniSOG оценивали по количеству формазана, образовавшегося в результате восстановления клетками раствора МТТ и растворенного в ДМСО (количество формазана пропорционально числу живых клеток). Кривые роста получали с помощью программного обеспечения GraphPrism 6. Значение IC₅₀ рассчитывали с помощью нелинейного регрессионного анализа.

Подтверждение прооксидантного механизма токсичности DARPIn-miniSOG. Для подтверждения механизма цитотоксичности рекомбинантного белка за счет генерации активных форм кислорода проводили облучение клеток описанным выше способом в присутствии аскорбиновой кислоты, выступавшей в роли антиоксиданта. Для установления концентрации аскорбиновой кислоты, которая не будет оказывать токсического влияния сама по себе, клетки рассеивали в 96-луночные планшеты как описано выше, и инкубировали 90 мин с PBS, содержащим аскорбиновую кислоту в концентрациях от 2 нМ до 2 мкМ. Максимальная концентрация аскорбиновой кислоты, не оказывавшая заметного цитотоксического влияния на клетки SK-BR-3, составила 60 нМ. Именно эта концентрация использовалась в дальнейшем при облучении клеток. Жизнеспособность клеток, облученных в присутствии аскорбиновой кислоты и без нее, также сравнивали по способности клеток восстанавливать бромид тетразолия.

Определение фракции гипопloidной ДНК. Долю клеток с фрагментированной ДНК определяли при помощи проточной цитофлуориметрии. Для этого клетки линии SK-BR-3 снимали с культурального пластика при помощи раствора версена, разделяли на пробы по 10^5 клеток, центрифугировали, отделяли от супернатанта и ресуспендировали в PBS, содержащем DAPI-miniSOG в концентрации 0,5 мкМ, и облучали синим светом (465 нм, 55 мВт/см²) 30 мин при 37°C. После облучения к клеткам добавляли 1 мл среды и инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение суток. В качестве отрицательного контроля апоптоза использовали клетки, инкубированные в тех же условия без белка. В качестве положительного контроля апоптоза использовали клетки, инкубированные 17 ч в растворе 500 мМ стауроспорина в питательной среде с 10% сыворотки. После завершения инкубации клетки дважды промывали PBS, добавляли к каждой пробе по 1 мл 70% этанола для пермеабиллизации клеточной мембраны, инкубировали на льду 30 мин. После этого клетки центрифугировали 5 мин при 1000 g и температуре 4°C, супернатант сливали, а клетки ресуспендировали в 1 мл PBS, содержащем 50 мкг пропидия йодида и 0,2 мг РНКазы А, и инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темноте. Полученные пробы анализировали на проточном цитометре BD Accuri C6.

Результаты и обсуждение

Для изучения механизма цитотоксического действия адресного фототоксина DAPI-miniSOG была выбрана клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, которая характеризуется суперпродукцией поверхностного клеточного рецептора HER2.

В качестве возможных механизмов клеточной гибели рассматривали два наиболее вероятных для клеток, культивируемых *in vitro*: апоптоз и некроз.

В качестве критериев их отличия были выбраны наличие или отсутствие фрагментации ДНК, а также морфология погибающих клеток.

При наблюдении в микроскоп за клетками аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, подвергшимися обработке фототоксином DAPI-miniSOG и последующему облучению синим светом, было замечено, что через 1,5–2 ч после прекращения облучения в клетках происходят морфологические изменения, характерные для некроза (рис. 1): клетки увеличивались в размере, происходило набухание и вакуолизация цитоплазмы, появлялась заметная гранулярность, клетки теряли характерную фибробластоподобную форму, при этом в большинстве клеток не наблюдалось формирование апоптотических телец. Кроме того, наблюдалась потеря целостности плазматической мембраны, что было доказано при окрашивании клеток йодидом пропидия (рис. 1).

Измерение количества ДНК в клетках и постклеточных элементах после облучения клеток линии SK-BR-3 в присутствии DAPI-miniSOG показывает, что в большинстве клеток остается исходное количество ДНК, а фракция subG₁ остается на уровне отрицательного контроля (рис. 2). Таким образом, токсическое действие белка DAPI-miniSOG не приводит к фрагментации ДНК и уменьшению ее содержания в постклеточных структурах, а значит не связано с индукцией апоптоза.

Для изучения цитотоксического действия DAPI-miniSOG *in vitro*, клетки SK-BR-3 (HER2-положительный контроль) и CHO (HER2-отрицательный контроль) инкубировали с белком DAPI-miniSOG в различных концентрациях (125 нМ — 3 мкМ) и подвергали воздействию синего света. Рисунок 3А наглядно иллюстрирует, что снижение жизнеспособности клеток SK-BR-3 наблюдалось после их обработки белком DAPI-miniSOG с последующим облучением. IC₅₀ в этом случае составила 800 нМ. В то же время, клетки CHO, не гиперэк-

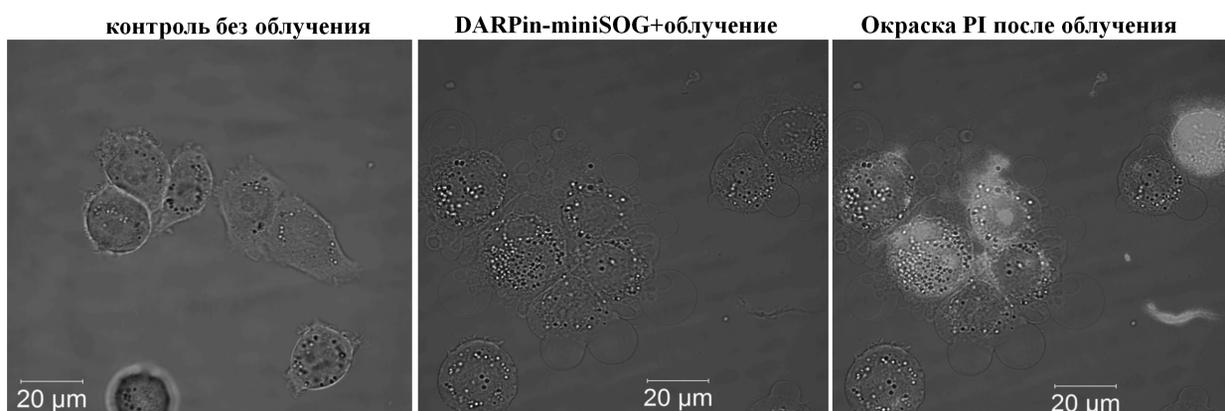


Рис. 1. Морфологические изменения HER2-положительных клеток SK-BR-3 под действием адресного фототоксина DAPI-miniSOG и облучения синим светом. Фотографии клеток сделаны с помощью лазерного сканирующего микроскопа Carl Zeiss LSM-710-NLO (Германия) в проходящем белом свете и в красном канале флуоресценции.

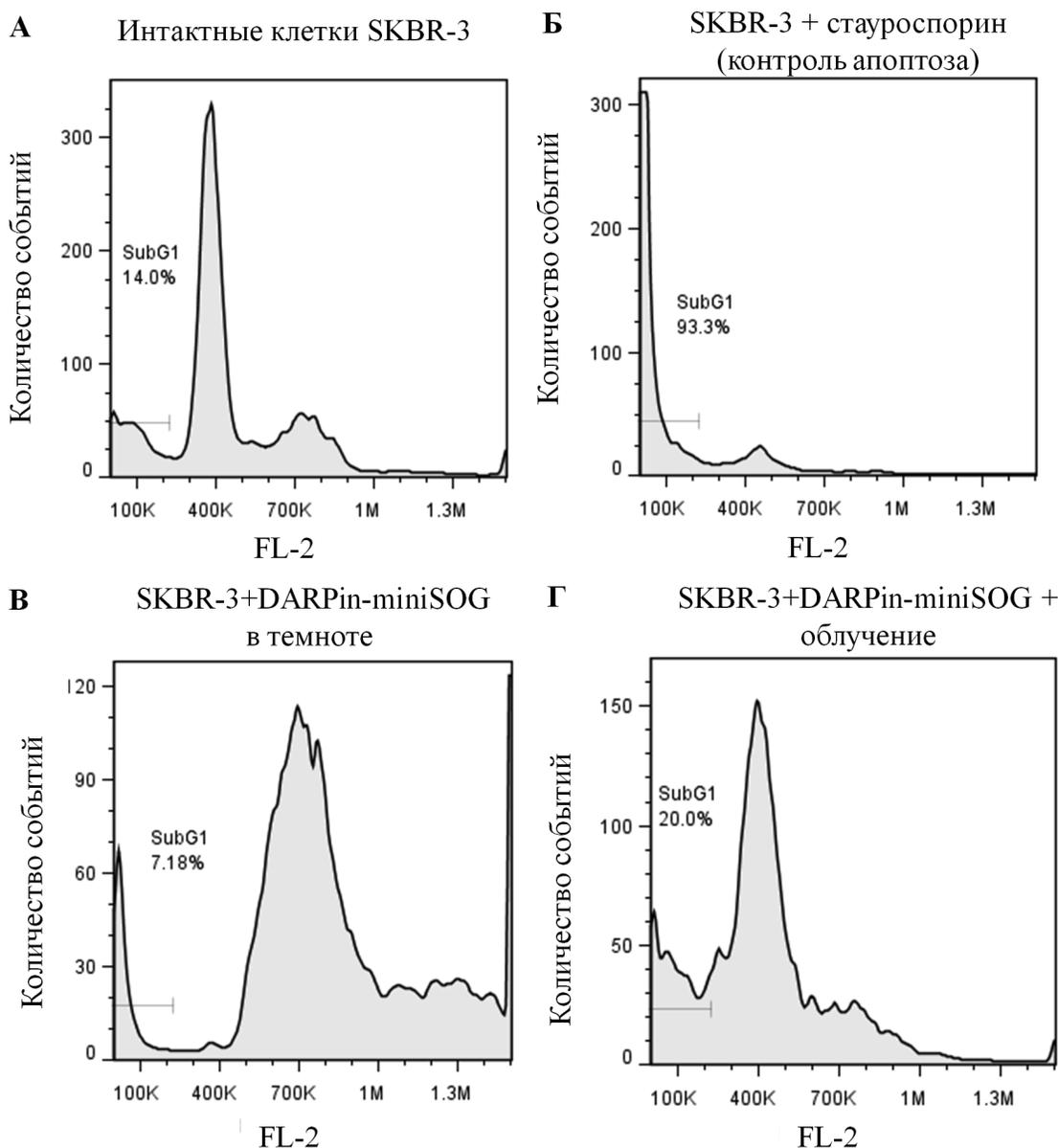


Рис. 2. Цитометрическое определение гипоплоидной ДНК в популяции клеток SK-BR-3. **А** — клетки SK-BR-3, обработанные буфером PBS (контроль некротических клеток). **Б** — клетки SK-BR-3, обработанные стауроспорином (контроль апоптоза). **В** — клетки SK-BR-3, обработанные DARPin-miniSOG без облучения. **Г** — клетки SK-BR-3, обработанные DARPin-miniSOG и подвергнутые облучению

прессирующие HER2, не снижали жизнеспособность при подобной обработке (рис. 3А).

Благодаря наличию кофактора ФМН в составе белковой глобулы, miniSOG вырабатывает активные формы кислорода (АФК), индуцирующие клеточную гибель [11, 12].

Хорошо известно, что аскорбиновая кислота является неферментативным антиоксидантом, способным защищать клетки от длительного воздействия АФК. Показано, что в качестве антиоксиданта аскорбиновая кислота эффективна в отношении супероксид-аниона, перекиси водорода, гидроксил-радикалов и синглетного кислорода [13]. Изучив влияние различных концентраций аскорбиновой кислоты на раковые клетки линии SK-BR-3, мы

установили, что аскорбиновая кислота в концентрации до 100 нМ не влияет на жизнеспособность клеток (рис. 3Б). Как показано на рис. 3А, облучение клеток в присутствии 60 нМ аскорбиновой кислоты предотвращает фотоиндуцированное цитотоксическое действие DARPin-miniSOG, повышая IC_{50} DARPin-miniSOG с 800 нМ до 7 мкМ (почти в 9 раз).

Наибольшего цитотоксического эффекта можно ожидать, когда фототоксин располагается на клеточной мембране. Хорошо известно, что ненасыщенные жирные кислоты, содержащиеся в большом количестве в плазматической мембране, являются главной мишенью активных форм кислорода [14]. Дополнительным фактором, вносящим вклад в фо-

тоиндуцированное повреждение липидов, является наличие молекулярного кислорода, который хорошо растворим в липидах. Таким образом, в липидном окружении фотосенсибилизатор имеет больше шансов, чем в водном, встретиться с молекулярным кислородом и выработать АФК. Кроме того, если АФК производятся внутри клетки, в клетке существует множество путей, как ферментативных, так и неферментативных, для поддержания внутриклеточного редокс-гомеостаза и защиты клетки от различных оксидантов [15]. Наши эксперименты с DARPin-miniSOG и аскорбиновой кислотой подтверждают эту гипотезу: будучи хорошим антиоксидантом для различных форм АФК, аскорбиновая кислота эффективно предотвращает окисление липидов, ингибируя цитотоксичность DARPin-miniSOG.

Таким образом, в работе изучены фотоиндуцированная цитотоксичность и механизм клеточной гибели, вызываемой фототоксином DARPin-miniSOG, на клетках аденокарциномы молочной железы человека. Наличие фрагментированной хромосомной ДНК, а также характерные морфологические изменения, которые проявляют клетки после воздействия адресного фототоксина, позволяют сделать вывод, что DARPin-miniSOG вызывает некроз раковых клеток. Клетки SK-BR-3, обработанные DARPin-miniSOG и подвергнутые облучению синим светом в присутствии аскорбиновой кислоты, сохраняют жизнеспособность, что подтверждает прооксидантный механизм действия фототоксина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-24-00106 — опыты по цитотоксичности и микроскопии; проект № 14-14-00813 — опыты по проточной цитометрии).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene // Science. 1987. Vol. 235. N 4785. P. 177–182.
2. Gusterson B.A., Gelber R.D., Goldhirsch A. et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer // J. Clin. Oncol. 1992. Vol. 10. N 7. P. 1049–1056.
3. Binz H.K., Amstutz P., Kohl A., Stumpp M.T., Briand C., Forrer P., Grutter M.G., Plückthun A. High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries // Nat. Biotechnol. 2004. Vol. 22. N 5. P. 575–582.
4. Interlandi G., Wetzel S.K., Settanni G., Plückthun A., Caflisch A. Characterization and further stabilization of designed ankyrin repeat proteins by combining molecular dynamics simulations and experiments // J. Mol. Biol. 2008. Vol. 375. N 3. P. 837–854.
5. Zahnd C., Kawe M., Stumpp M.T., Pasquale C., Tamaskovic R., Nagy-Davidescu G., Dreier B., Schibli R., Binz H.K., Waibel R., Plückthun A. Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: effects of affinity and molecular size // Cancer Res. 2010. Vol. 70. N 4. P. 1595–1605.

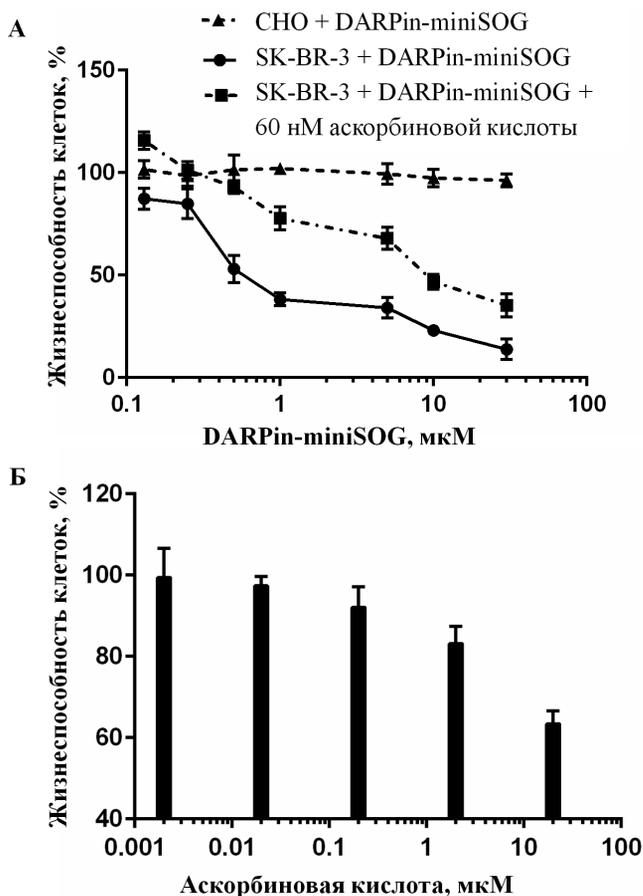


Рис. 3. Оценка цитотоксического действия адресного фототоксина DARPin-miniSOG *in vitro*. А. Зависимость жизнеспособности HER2-положительных клеток SK-BR-3 и HER2-отрицательных клеток CHO от концентрации фототоксина под действием облучения, а также зависимость жизнеспособности клеток SK-BR-3 в присутствии 60 нМ аскорбиновой кислоты. Б. Чувствительность клеток SK-BR-3 к различным концентрациям аскорбиновой кислоты.

6. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. Man-made antibodies and immunoconjugates with desired properties: function optimization using structural engineering // Rus. Chem. Rev. 2015. Vol. 84. N 1. P. 1–26.
7. Steiner D., Forrer P., Plückthun A. Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display // J. Mol. Biol. 2008. Vol. 382. N 5. P. 1211–1227.
8. Shu X., Lev-Ram V., Deerinck T.J., Qi Y., Ramko E.B., Davidson M.W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien R.Y. A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms // PLoS Biol. 2011. Vol. 9. N 4. e1001041.
9. Шилова О.Н., Прошкина Г.М., Лебедево Е.Н., Деев С.М. // Интернализация и рециркуляция рецептора HER2 при взаимодействии адресного фототоксичного белка DARPin-miniSOG с клетками аденокарциномы молочной железы человека. 2015. Acta Naturae. №3. С. 79–86.
10. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Methods. 1983. Vol. 65. N 1–2. P. 55–63.

11. *Ryumina A.P., Serebrovskaya E.O., Shirmanova M.V., Snopova L.B., Kuznetsova M.M., Turchin I.V., Ignatova N.I., Klementieva N.V., Fradkov A.F., Shakhov B.E., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A.* Flavoprotein miniSOG as a genetically encoded photosensitizer for cancer cells // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. Vol. 1830. N 11. P. 5059–5067.

12. *Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M.* Genetically encoded immunophotosensitizer 4D5scFv-miniSOG is a highly selective agent for targeted photokilling of tumor cells in vitro // *Theranostics.* 2013. Vol. 3. N 11. P. 831–840.

13. *Gülçin İ.* Antioxidant activity of food constituents: an overview // *Arch. Toxicol.* 2012. Vol. 86. N 3. P. 345–391.

14. *Girotti A.W.* Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms // *J. Photochem. Photobiol.* 2001. Vol. 63. N 1-3. P. 103–113.

15. *Finkel T.* Signal transduction by reactive oxygen species // *J. Cell. Biol.* 2011. Vol. 194. N 1. P. 7–15.

Поступила в редакцию

06.07.15

ANTI-HER2 PHOTOTOXIN BASED ON FLAVOPROTEIN MINISOG CAUSES OXIDATIVE STRESS AND NECROSIS ON HER2-POSITIVE CANCER CELLS

O.N. Shilova¹, G.M. Proshkina^{1,}, A.V. Ryabova², S.M. Deyev^{1,3}*

¹ *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul. 16/10, GSP-7, Moscow, 117997, Russia;*

² *Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, Vavilov ul. 38, Moscow, 119991, Russia;*

³ *Department of Immunology, School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia;*

**e-mail: gmb@ibch.ru*

Development and functional characterization of novel high-affinity protein compounds that can selectively kill human cancer cells, is an important task of modern biomedical research. In this work the cytotoxicity of recombinant phototoxic protein DARPIn-miniSOG on HER2-positive breast adenocarcinoma human cells has been studied. It was determined that targeted phototoxin DARPIn-miniSOG specifically interacts with HER2 receptor and causes necrotic death of HER2-positive cells induced by illumination. Treatment of the cells with DARPIn-miniSOG in the presence of ascorbic acid eliminates the light-induced cytotoxic action of the protein that confirmed the mechanism of action of the protein through oxidative stress.

Key words: *DNA hypoploid fraction, HER2 receptor, oxidative stress, targeted phototoxin.*

Сведения об авторах:

Шилова Ольга Николаевна — инженер лаборатории молекулярной иммунологии института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Тел.: 8-495-330-63-92; e-mail: olchernykh@yandex.ru.

Прошкина Галина Михайловна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории молекулярной иммунологии института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Тел.: 8-495-330-63-92; e-mail: gmb@ibch.ru.

Рябова Анастасия Владимировна — канд. физ-мат. наук, ст. науч. сотр. лаборатории лазерной биоспектроскопии института общей физики им. А.М. Прохорова РАН. Тел.: 8-499-503-81-11; e-mail: nastya.ryabova@gmail.com.

Деев Сергей Михайлович — докт. биол. наук, проф. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией молекулярной иммунологии института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Тел.: 8-499-724-71-88; e-mail: deyev@ibch.ru.