

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Тощакوف Владимир Юрьевич

**Механизмы инициации сигналинга, опосредованного взаимодействиями TIR
доменов, и экспериментальные подходы
к его ингибированию**

Специальность 3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена в Центре генетики и наук о жизни Научно-технологического университета «Сириус».

Официальные оппоненты:

Купраш Дмитрий Владимирович — доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук, лаборатория передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, главный научный сотрудник

Шайтан Алексей Константинович — доктор физико-математических наук, член-корреспондент РАН, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, кафедра биоинженерии, профессор

Апт Александр Соломонович — доктор биологических наук, профессор, Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, отдел иммунологии, лаборатория иммуногенетики, главный научный сотрудник

Защита диссертации состоится 6 ноября 2026 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.1 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория М-1.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/4040>

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Д.Б. Киселевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Белковые взаимодействия лежат в основе всех биологических процессов. Взаимодействия белков, участвующих в передаче биологической информации, отличаются от взаимодействий остального протеома тем, что они ведут к образованию специфических структур, формирующихся в ответ на слабые внешние сигналы из компонентов, находящихся в клетке в отсутствие сигнала в диссоциированном состоянии. В подавляющем большинстве случаев сборка таких транзиторных структур, именуемых в литературе сигнальными комплексами, происходит за счет взаимодействий специализированных белковых доменов, называемых доменами взаимодействия белков (ДВБ).

TIR домены представляют собой один из наиболее широко распространённых классов ДВБ, представленный во всех основных филогенетических группах как про-, так и эукариот. Содержащие TIR домены белки животных являются важнейшим компонентом врождённой системы иммунитета. Так, TIR домены, присутствующие в Toll-подобных рецепторах (TLR) высших животных, а также в адаптерных белках, функционирующих в связке с TLR, ответственны за начальные рецептор-адаптерные взаимодействия при активации этих рецепторов.

TIR домены относятся к типу ДВБ, функционирование которых не требует посттрансляционных модификаций. Такие домены характеризуются наличием нескольких сайтов связывания, способных одновременно устанавливать множественные гомо- или гетеротипические взаимодействия с доменами своего типа. Основным механизмом, обеспечивающим сигнал-зависимую сборку сигнальных комплексов, составленных из таких ДВБ, является кооперативный механизм взаимодействия компонентов, при котором привлекаемые домены одновременно взаимодействуют с несколькими доменами предсуществующего комплекса, тем самым увеличивая стабильность начальной структуры (Рис. 1а и 1в—

д) (Toshchakov et al., 2011). Кооперативность взаимодействия ДВБ, таким образом, возникает в случаях, когда димеризация ДВБ ведёт к образованию двухкомпонентного сайта связывания, составленного из сайтов связывания на обоих мономерах исходного димера (Рис. 1г).

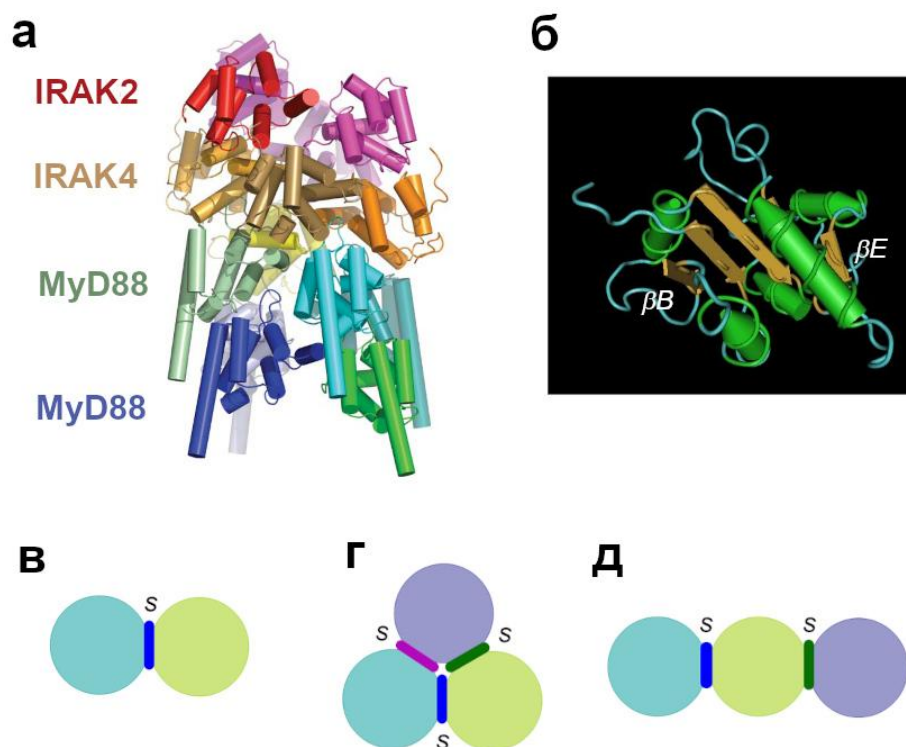


Рисунок 1 — Структурные аспекты формирования сигнальных комплексов

(а) Структура Миддосомы – спирального сигнального комплекса, образуемого доменами смерти адаптерного белка MyD88 и киназ IRAK4 и IRAK2.

(б) Третичная структура TIR доменов. TIR домены образованы пятью спиральными участками, чередующимися с β -тяжами. Тяжи формируют центрально расположенный параллельный β -лист.

(в) Схематическое изображение димерного комплекса, сформированного двумя глобулярными ДВБ. s – площадь контакта доменов. Площадь контакта в бинарном взаимодействии TIR доменов не превышает $1000 \text{ \AA}^2$, что существенно меньше площади бинарных контактов в стабильных белковых комплексах.

(г) Пример кооперативного взаимодействия ДВБ. В кооперативном взаимодействии привлекаемый домен одновременно взаимодействует как минимум с двумя доменами исходного комплекса, стабилизируя его. Площадь контакта в таком взаимодействии глобулярных белков приблизительно равного размера утраивается по сравнению с бинарным взаимодействием, что и ведет к образованию стабильного комплекса (Toshchakov et al., 2011).

(д) Пример некооперативного взаимодействия ДВБ. При таком взаимодействии площадь контакта в тримере только удваивается. Образованный тримерный комплекс не стабильнее составляющих его димеров.

Несмотря на то, что базовые принципы белок-белкового распознавания были сформулированы ещё в середине 70-х годов прошлого века, предсказание и дизайн белковых пар, которые бы взаимодействовали с высокой аффинностью и специфичностью, остаётся проблематичным до настоящего времени. Транзиторные взаимодействия сигнальных ДВБ особенно трудны к описанию вследствие как множественности сайтов связывания, типично присутствующих на ДВБ, так и относительной слабости и мультиспецифичности каждого из бинарных взаимодействий.

Взаимодействия ДВБ, присутствующих на TLR и адаптерных белках, непосредственно взаимодействующих с TLR, необходимы для инициации внутриклеточного сигнала и активации защитных механизмов при инфекционных и иных воспалительных заболеваниях. Таким образом, изучение принципов распознавания компонентов в процессе сборки сигнальных комплексов при активации TLR остаётся актуальным как с теоретической, так и с практической точки зрения.

Степень разработанности темы исследования

Представленные к защите исследования были выполнены в течение продолжительного периода времени, в ходе которого представления о механизмах функционирования TIR доменов существенно эволюционировали. К началу работы диссертанта в этой области, в начале нулевых годов этого века, TIR домены определялись как гомологичная область, обнаруживающаяся в трёх классах белков: в рецепторах семейства IL-1R, в Толл белках насекомых и Толл-подобных рецепторах хордовых, а также в R (Resistance) белках высших растений. TIR домены прокариот известны не были. Единственной функцией TIR доменов считалась способность устанавливать гомо- и гетеротипические взаимодействия с доменами своего класса, причём механизм, обеспечивающий TIR-TIR распознавание, определён не был, и был известен только один сайт, ответственный

за установление TIR-TIR взаимодействий – петля ВВ (петля между вторым тяжом и вторым спиральным участком). Значительные усилия исследователей в то время были сосредоточены на поиске посттрансляционных модификаций, которые могли бы быть ассоциированы с механизмом активации TIR доменов.

Исследования автора внесли существенный вклад в понимание механизмов инициации внутриклеточной передачи сигнала при активации TLR. В частности, были впервые описаны существенные различия в спектрах цитокинов, индуцированных агонистами TLR4 и TLR2 в макрофагах, и выяснен механизм возникновения этих различий (Toshchakov et al., 2002). Это открытие продемонстрировало специфичность взаимодействий TIR доменов, поскольку показало, что адаптерные белки специфически рекрутируются TIR доменами TLR4 и TLR2 при активации.

Дальнейшие исследования автора существенно продвинули понимание механизмов распознавания TIR доменов, сформулировали кооперативный принцип функциональных взаимодействий TIR доменов, не требующий ковалентной модификации белка для инициации взаимодействия (Toshchakov et al., 2011), и охарактеризовали многие сайты связывания, присутствующие на отдельных доменах (Toshchakov et al., 2005, 2007, 2011; Couture et al., 2012; Piao et al., 2013a, 2013b, 2015, 2016; Javmen et al., 2018, 2020, 2023). С другой стороны, существенный вклад в понимание механизмов распознавания TIR доменов был внесён независимыми структурно-биологическими исследованиями, которые охарактеризовали комплексы, спонтанно формируемые рекомбинантными TIR доменами белков TIRAP и MyD88.

Несмотря на существенный прогресс в понимании механизмов функционирования ДВБ, достигнутый в последние два десятилетия, существуют различия в интерпретации результатов, полученных различными методами и группами, показывая, что точная формулировка принципов взаимного

распознавания TIR доменов, а также полная каталогизация сайтов TIR-TIR связывания, требуют дальнейших исследований.

Цель исследования

Целями настоящего исследования является выяснение принципов белок-белкового распознавания во внутриклеточной передаче сигналов посредством индуцированных взаимодействий TIR доменов и разработка молекулярных инструментов для подавления этих взаимодействий.

Задачи исследования

Достижение поставленных целей требовало решения следующих задач:

1. идентификация пептидов, способных блокировать внутриклеточные взаимодействия TIR доменов;
2. анализ эволюционной вариабельности TIR доменов с целью выявления функциональных сайтов связывания;
3. идентификация TIR доменов, преимущественно связываемых блокирующими пептидами (БП) в клетках;
4. детальная оценка эффективности пептидных ингибиторов TLR *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна и практическая значимость работы

Включённое в материалы данной диссертационной работы открытие того, что активация TLR4, в отличие от активации TLR2, индуцирует раннюю продукцию интерферона- β , посредством чего существенно расширяется спектр цитокинов, продуцируемых макрофагами (Toshchakov et al., 2002), изменило господствующую на то время парадигму о том, что различные TLR, активируясь различными классами микробных молекул, продуцируют в целом сходный ответ. Это открытие привело к пониманию специфичности взаимодействий, осуществляемых TIR доменами, идентификации адаптерных белков MyD88-независимого сигнального

пути, с последующей характеристикой многих сайтов связывания, присутствующих на TIR доменах.

Выяснение принципов распознавания белков, лежащих в основе формирования сигнальных комплексов, чрезвычайно актуально как с теоретической, так и с практической точки зрения. Понимание этих принципов делает возможным разработку молекулярных инструментов для специфического подавления взаимодействий белков, необходимых для внутриклеточной передачи биологических сигналов.

Поскольку подавляющее большинство новых фармакологических препаратов направлены на модуляцию сигнальных путей, новый класс блокаторов передачи биологических сигналов существенно расширит возможности в создании инновационных фармакологических препаратов, а также в инженерии белков и биологических систем с заданными свойствами.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Топология сайтов связывания TIR доменов, ответственных за сборку сигнальных комплексов при активации TLR, сохранна как для различных членов семейства TLR, так и для их адаптерных белков.
2. Не существует общей аминокислотной последовательности, характерной для сайтов функциональных взаимодействий TIR доменов, однако такие последовательности могут обнаруживаться на уровне отдельных подсемейств семейства TLR, а также в TIR доменах ортологичных адаптерных белков.
3. Начальный этап сборки олигомерных сигнальных комплексов при активации TLR осуществляется за счёт 4-х сайтов связывания, присутствующих на TIR доменах TLR и их адаптерных белков: 2 сайта располагаются в районах краевых тяжей β -листа; два других сайта формируются α -спиралями, располагающимися на выпуклой стороне β -листа, α -спиралью C (в некоторых случаях вместе с

прилегающей к ней α -спиралью В) и α -спиралью D или соответствующим неспирализованным участком.

4. Пептиды, соответствующие сегментам белковых последовательностей, формирующим сайт связывания TIR домена или его бóльшую часть, и снабженные пептидным вектором, могут эффективно блокировать передачу сигнала TLR.
5. Наиболее эффективные пептидные ингибиторы TIR-TIR взаимодействий способны блокировать системный ответ на активацию TLR в экспериментах на мышах и предотвращать гибель животных, вызванную такой активацией.

Личный вклад соискателя

Автор лично разработал методологию исследования, проводил планирование экспериментов, принимал непосредственное участие в их выполнении, осуществлял анализ и интерпретацию результатов, формулировал выводы и готовил публикации. В частности, автор экспериментально охарактеризовал различия в спектрах цитокинов, продуцируемых макрофагами при активации TLR4 и TLR2, и показал механизм возникновения этих различий (статьи 1–4 Списка публикаций). Эти работы были проведены в сотрудничестве с Dr. Stefani N. Vogel, экспертом мирового уровня в области TLR и физиологии макрофагов. Автором самостоятельно была разработана концепция и отработана методика применения БП в культуре клеток (публикации 5–7 и 9 Списка) и на мышах (статьи 10, 12). С 2010 года автор руководил инициативным научным проектом “Deciphering the architecture of TLR signaling complexes”, результаты которого составили основу диссертации (статьи 9–22). Эксперименты по изучению связывания БП с TIR доменами методами FRET-FLIM (статьи 9, 13–15, 17, 18 и 22) проводились совместно с Drs. Henryk Szmazinski и Joseph R. Lakowicz, выдающимися экспертами мирового уровня в области анализа флуоресценции и разработчиками метода FLIM. Биоинформатический анализ последовательностей TIR доменов (статья 19)

проводился совместно с Dr. Andrew F. Neuwald, выдающимся биологом-теоретиком и создателем программных инструментов, использовавшихся при анализе. Эксперименты с использованием моделей вирусной инфекции проходили с участием Dr. Kari Ann Shirey (статья 15). В статьях 8, 13, 21 и 24 использовались БП, разработанные в предшествующих работах автора, в этих работах автор выступал в роли консультанта при планировании и выполнении экспериментов, использующих БП.

Методология и методы исследования

Представленные к защите исследования выполнены с применением широкого спектра методов, который включает в себя как стандартные методы молекулярной и клеточной биологии, так и оригинальные методы, специально разработанные для достижения целей данного исследования, а также компьютерный анализ эволюционной изменчивости TIR доменов.

Разработанные оригинальные методические подходы к решению задач исследования включают:

1. Концепцию скрининга пептидных библиотек для идентификации сайтов связывания ДВБ и разработки ингибиторов передачи сигнала (Toshchakov et al., 2011).
2. Оригинальную FRET систему для количественной оценки связывания БП с TIR доменами непосредственно в клетке. Эта система предусматривает транзиторную эктопическую экспрессию панели TIR доменов, каждый из которых связан с белковой флуоресцентной меткой, белком Cerulean (Cer). Прямое TIR-пептидное связывание оценивается в данной системе по тушению флуоресценции белковой метки при обработке клеток БП, мечеными флуорофором, способным поглощать флуоресценцию Cer (Toshchakov et al., 2011).

3. Микроскопию времени жизни флуоресценции (FLIM) для оценки связывания пептидов с TIR доменами посредством Фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET) (Szmecinski et al., 2014; Piao et al., 2015; Javmen et al., 2018).
4. Крупномасштабный статистический анализ белковых последовательностей для выявления эволюционно сохранных мотивов, специфичных для различных классов TIR доменов (Toshchakov & Neuwald, 2020). Программа MAPGAPS использовалась для обнаружения и выравнивания более 26 тысяч последовательностей TIR доменов. Полученная аминокислотная матрица анализировалась с помощью программного пакета BPPS (Bayesian Partition with Pattern Selection) для построения иерархической классификации TIR доменов и выявления мотивов последовательностей, характерных для отдельных классов и подклассов полученной иерархии.

Стандартные методы, использованные в работе, включают:

- Оценку функции TLR в первичных культурах макрофагов мышей и стабильных клеточных линиях (вестерн-блоттинг, количественная оценка экспрессии цитокиновой мРНК, иммуноферментный анализ).
- Оценку системного влияния БП на TLR в моделях *in vivo*.
- Оценку способности БП модулировать ответ на вирусный патоген.

Степень достоверности и апробация результатов

Материалы диссертационной работы отражены в рецензируемых статьях в высокорейтинговых научных журналах, включая *Nature Immunology*, *PNAS*, *Journal of Immunology*, *Cell Reports* и *Journal of Biological Chemistry*, а также в 4 патентах. Статьи, непосредственно связанные с темой диссертации, были процитированы в специальной литературе более 4000 раз, что подтверждает достоверность и значимость полученных результатов.

Наиболее значимые результаты диссертационного исследования регулярно представлялись в форме устных и стендовых докладов на международных научных

конференциях, неполный список которых включает: конференцию “Experimental Biology 2005”, проводимую Федерацией американских обществ экспериментальной биологии (FASEB) в Сан-Диего, США; конференцию, совместно организованную Обществом биологии лейкоцитов (Society for Leukocyte Biology) и Международным обществом эндотоксина и врождённого иммунитета (International Endotoxin and Innate Immunity Society) и проведённую в Сан-Антонио, США в 2006 году; 97-ю, 99-ю и 100-ю Ежегодные конференции, проводимые Американской ассоциацией иммунологов (American Association of Immunologists) в Балтиморе, Бостоне и Хонолулу (США) в 2010, 2012 и 2013 годах, соответственно; симпозиумы серии Keystone “Drugs from Bugs: The Anti-Inflammatory Drugs of Tomorrow,” Сноубёрд, США, 2011 год, и “Inflammatory Diseases: Recent Advances in Basic and Translational Research and Therapeutic Treatments,” Ванкувер, Канада, 2013 год; а также 5-ый Европейский конгресс иммунологии (ECI 2018), Амстердам, Нидерланды, 2018 год.

Наиболее эффективные БП, идентифицированные в исследованиях на культуре клеток, были протестированы, и их эффективность подтверждена в экспериментах на лабораторных животных. Многие из идентифицированных ингибирующих пептидов были ресинтезированы и повторно использованы в контрольных экспериментах в последующих исследованиях автора, а также подтверждены в независимых исследованиях других групп. Концепция и экспериментальные модели, разработанные и применённые нами для изучения TIR доменов высших животных, были с успехом применены независимыми группами для изучения бактериальных и других TIR доменов.

Основные положения, результаты и выводы диссертации отражены в 24 научных трудах, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 276 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Работа содержит 70 рисунков и 3 таблицы. Список литературы включает 215 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Демонстрация специфичности взаимодействий TIR доменов

1.1. Различия в спектрах цитокинов, индуцируемых агонистами TLR2 и TLR4

Первым этапом исследований стало выявление принципиальных различий в функционировании отдельных представителей семейства Толл-подобных рецепторов. В экспериментах на первичных перитонеальных макрофагах мышей было показано, что активация TLR4 липополисахаридом (LPS), в отличие от активации TLR2 пальмитоилированными липопептидами, индуцирует более широкий спектр цитокинов (Рис. 2а) (Toshchakov et al., 2002). В частности, отмечалось отсутствие индукции хемокинов IP-10 и MCP-5, а также IFN- γ и iNOS при использовании для стимуляции липопептида Pam3Cys, в то время как Pam3Cys и LPS активировали экспрессию IL-1 β и TNF приблизительно в равной степени (Рис. 2а). Также не отмечалось существенных различий и в активации МАП киназ при стимуляции макрофагов LPS и Pam3Cys. Примечательно, что различия в экспрессии цитокинов сохранялись в широком диапазоне концентраций агонистов (Рис. 2а), а также в течение длительного времени после стимуляции (Рис. 2г).

1.2. Стимуляция TLR4 вызывает активацию фактора транскрипции STAT-1

При поиске вероятных причин, ответственных за различия в спектре цитокинов, индуцируемых агонистами TLR4 и TLR2, было установлено, что

стимуляция TLR4, в отличие от стимуляции TLR2, вызывает фосфорилирование фактора транскрипции STAT-1 по сайту Tyr701 (Рис. 2б). Активация STAT-1 является характерной чертой интерферонового ответа и ответственна за индукцию интерферон-зависимых генов.

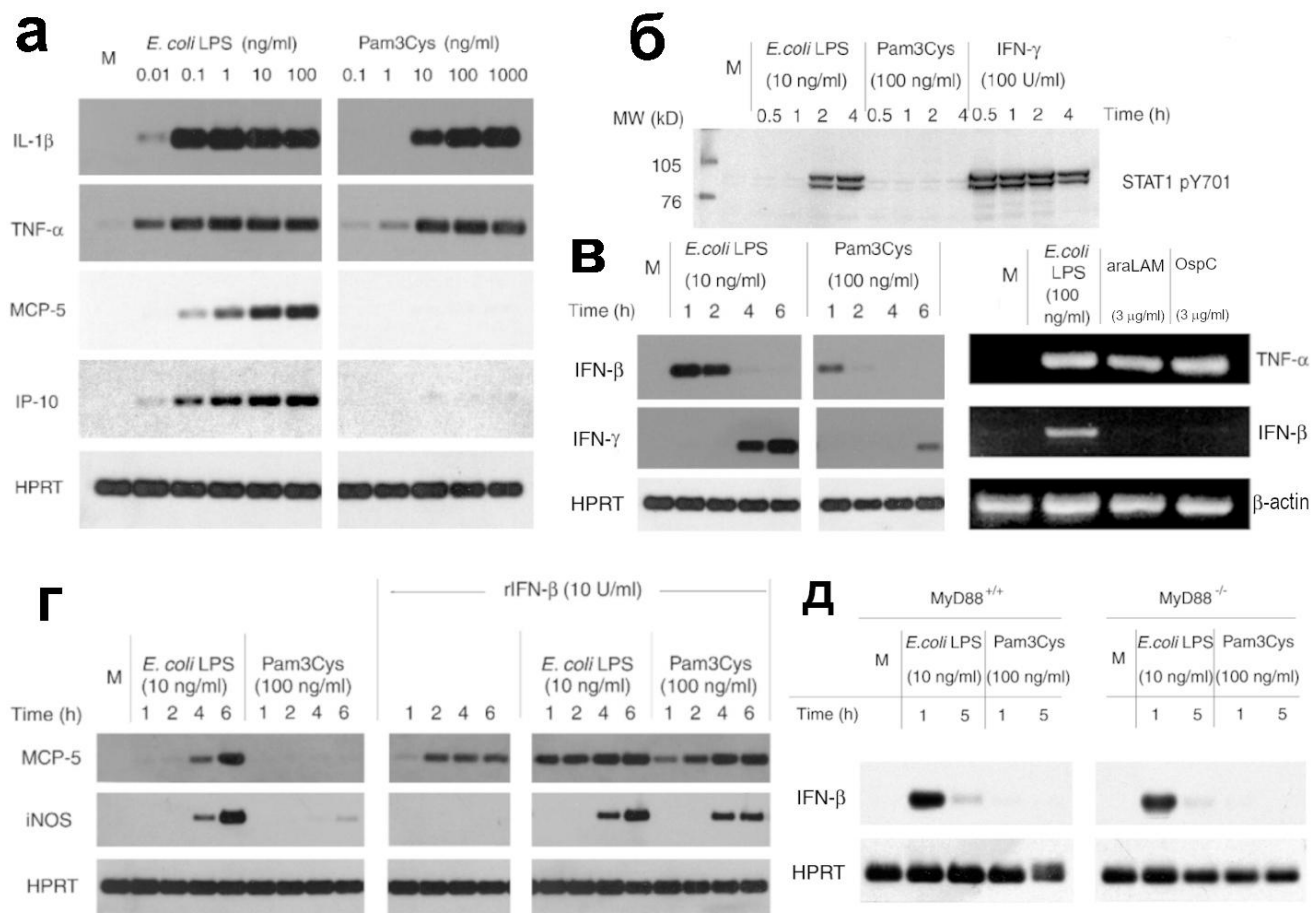


Рисунок 2 — Дифференциальная индукция экспрессии цитокинов агонистами TLR4 (*E. coli* LPS) и TLR2 (Pam3Cys, araLAM, OspC) в культуре перитонеальных макрофагов мышей линии C3H/HeOuJ

а – Различия в спектрах цитокинов, индуцируемых агонистами TLR4 и TLR2

б – Дифференциальная активация фактора транскрипции STAT-1 агонистом TLR4 (*E. coli* LPS) и TLR2 (Pam3Cys)

в – Ранняя индукция экспрессии интерферона-β агонистом TLR4 ответственна за дифференциальную активацию STAT-1

г – Костимуляция интерфероном-β нивелирует различия в спектрах медиаторов воспаления, индуцируемые агонистами TLR4 и TLR2

д – LPS стимулирует раннюю экспрессию интерферона-β приблизительно в равной степени в макрофагах мышей, дефицитных по гену *Myd88*, и соответствующей линии мышей дикого типа.

1.3. Ранняя индукция интерферона- β при активации TLR4

Эксперименты с использованием ингибитора транскрипции циклогексимида, антител, блокирующих различные интерфероны, а также кинетика интерфероновой ответа на стимуляцию TLR, показали, что ранняя продукция интерферона- β при активации TLR4 ответственна за активацию STAT-1 и наблюдаемые различия в спектрах цитокинов (Рис. 2в, г).

1.4. MyD88-независимость TLR4-зависимого фосфорилирования STAT-1

Эксперименты на макрофагах, полученных от мышей с делецией гена MyD88, продемонстрировали, что TLR4-зависимое фосфорилирование STAT-1 по сайту Tyr701 и экспрессия интерферона- β не зависят от присутствия адаптерного белка MyD88 (Рис. 2д). Это указывало на существование MyD88-независимого пути передачи сигнала с TLR4 и впоследствии привело к открытию адаптеров TRIF и TRAM.

Представленные в разделе 1.1 открытия имели фундаментальное значение, так как впервые продемонстрировали, что отдельные представители семейства TLR не только распознают различные классы патоген-ассоциированных молекулярных структур, но и активируют различные наборы сигнальных молекул, что и приводит к различиям в спектре индуцируемых цитокинов. Наиболее вероятной причиной данного феномена представлялись различия в специфичности белковых взаимодействий, осуществляемых TIR доменами отдельных TLR, поскольку TIR домены являются общим для всех TLR цитоплазматическим доменом, ответственным за инициализацию внутриклеточного сигнала.

2. Демонстрация мультивалентности взаимодействий TIR доменов

2.1. Скрининг библиотек блокирующих пептидов

Для выявления сайтов функционально значимых взаимодействий TIR доменов была разработана оригинальная методология скрининга библиотек пептидов,

представляющих различные структурные элементы TIR доменов. Протестированные пептидные библиотеки представляли TIR домены TLR, а также адаптерных белков, рекрутируемых к TLR при активации. Библиотеки состояли из 11–14 пептидов, каждый из которых соответствовал сегменту первичной последовательности, формирующему нефрагментированный участок поверхности TIR домена, способный функционировать как сайт TIR-TIR взаимодействия (Рис. 3а–в). Отдельные пептиды библиотек состояли из двух функциональных частей:

- пенетратин (проникающий в клетки пептид-вектор из белка *Antennapedia* дрозофил длиной 16 аминокислотных остатков);
- блокирующий сегмент, представляющий собой участок последовательности TIR домена длиной 9–15 аминокислотных остатков, который в контексте трёхмерной структуры белка формирует нефрагментированный участок поверхности (Рис. 3а–в).

Было проведено систематическое исследование библиотек пептидов, представляющих TIR домены TLR1, 2, 4, 5, 6, 7 и 9, а также адаптерных белков TIRAP, TRAM и TRIF. Библиотеки тестировались на способность отдельных пептидов ингибировать TLR-индуцированную раннюю экспрессию (Рис. 3г) или секрецию цитокинов, а также TLR-зависимое фосфорилирование различных сигнальных белков (Рис. 3д и 3е).

В результате скрининга пептидных библиотек, представляющих различные TIR домены, (всего было протестировано 150 вектор-содержащих пептидов), было идентифицировано 32 ингибитора, включая пептиды, содержащие концевые делеции. 21 ингибиторный пептид происходил из библиотек, представляющих TIR домены TLR. 11 пептидов были идентифицированы при скрининге библиотек TIR доменов адаптеров. Последовательности ингибиторных пептидов, упомянутых в тексте автореферата, представлены в Таблице 1 ниже, а их полный список представлен в Таблице 3 полного текста диссертации. Также, участки

последовательности TIR доменов, проявляющие выраженные ингибиторные свойства, показаны подчёркиванием в выравнивании рисунка 3в.

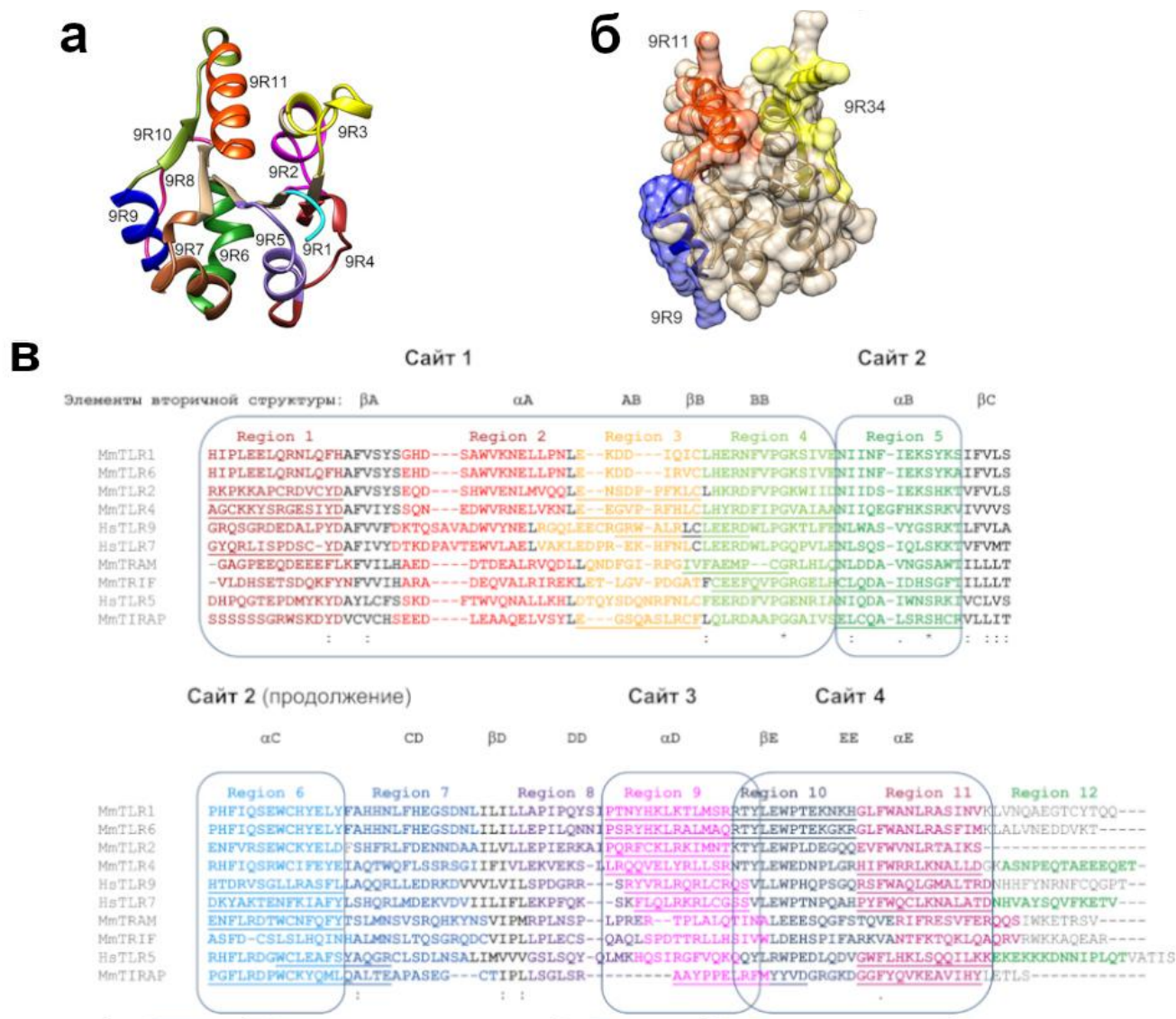
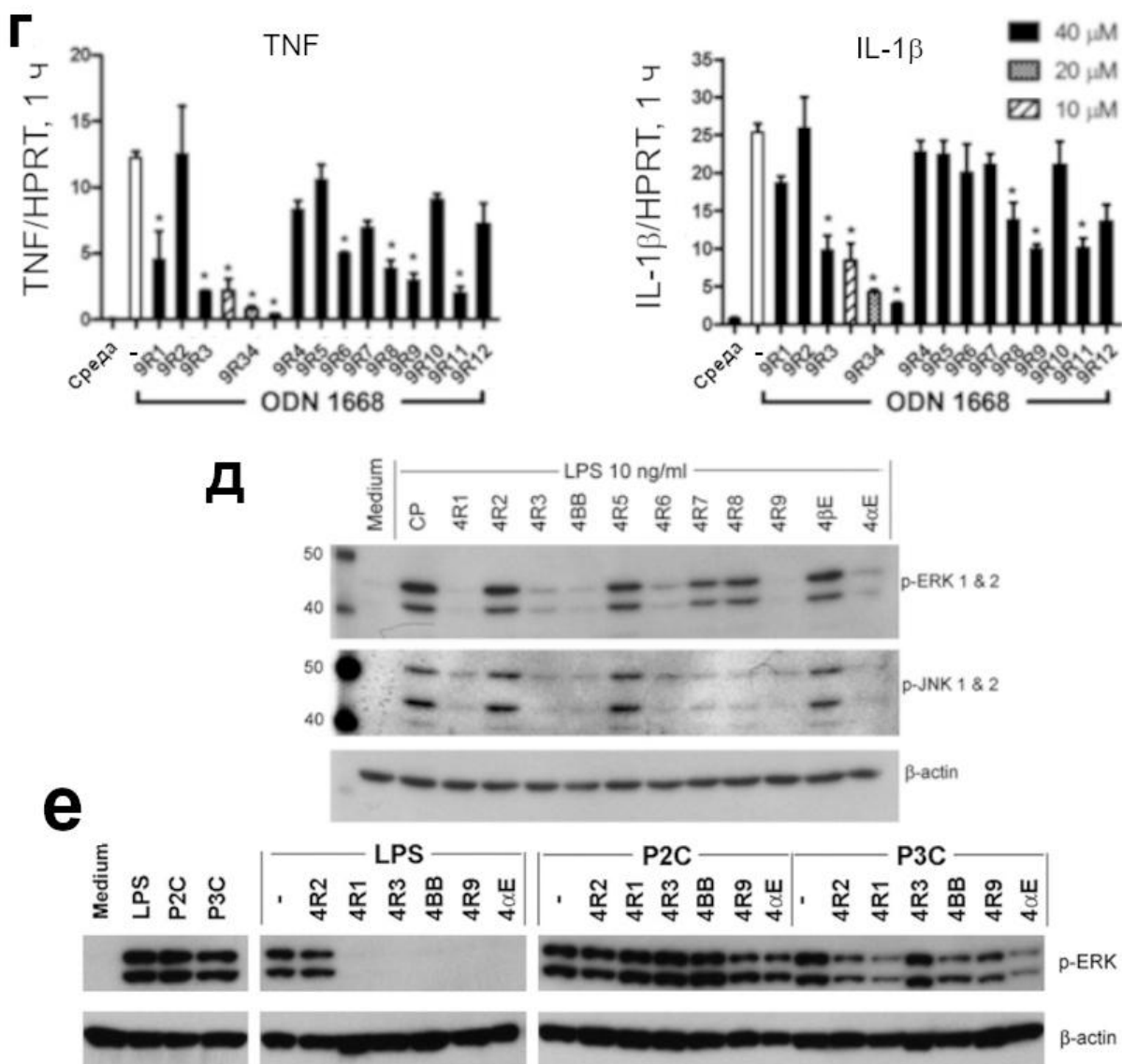


Рисунок 3 — Дизайн пептидных библиотек и примеры результатов их скрининга

а, б – Пространственные модели TIR домена TLR9, показывающие сегменты последовательности, соответствующие отдельным БП

в – Выравнивание последовательностей TIR доменов, показывающее сегменты, соответствующие отдельным БП, выбранным для первичного скрининга. Участки, представляющие отдельные БП (регионы 1–12), выделены различными цветами. Элементы вторичной структуры TIR доменов последовательно обозначены заглавными буквами английского алфавита, начиная с N-конца, следующим образом: спирали — α A– α E; тяжи — β A– β E; петли обозначены двумя заглавными буквами, например, BB — это петля, соединяющая второй тяж со второй спиралью. Аминокислотные остатки, показанные чёрным, не были включены в состав БП, поскольку они образуют сердцевину домена и не экспонированы на поверхности. Участки последовательностей, проявляющие выраженные ингибиторные свойства в составе БП, подчёркнуты.



Продолжение рисунка 3 — Дизайн пептидных библиотек и примеры результатов их скрининга

г – Влияние пептидов библиотеки TLR9 на экспрессию *Tnf* и *IL-1 β* , индуцированную иммуностимулятором олигонуклеотидом ODN1668 в дифференцированных костномозговых макрофагах

д, е – Влияние пептидов библиотеки, представляющей TIR домен TLR4, на фосфорилирование МАП киназ, индуцированное агонистом TLR4 LPS или пальмитоилированными липопептидами Pam2Cys и Pam3Cys, агонистами TLR2, в перитонеальных макрофагах мышей.

2.2. Позиции ингибиторно-активных БП, происходящих из TIR доменов TLR

Наиболее эффективные БП, идентифицированные при скрининге пептидов, соответствующих различным сегментам последовательностей TIR доменов TLR, представляли следующие структурные элементы/участки поверхности доменов:

- **β-тяж В и/или прилегающие к β-тяжу В петли АВ и ВВ** – одна из наиболее консервативных областей TIR доменов TLR. Примером высокоактивного ингибирующего пептида, происходящего из данной области, является пептид **9R34**, происходящий из TIR домена TLR9. Этот пептид и его урезанная версия **9R34-ΔN** эффективно ингибировали экспрессию (Рис. 3г) и секрецию цитокинов, индуцированную агонистом TLR9 (Javmen et al., 2018). Другим примером ингибирующего пептида этой группы является пептид **4ВВ**, происходящий из петли ВВ TIR домена TLR4. Этот БП эффективно ингибировал индуцированную LPS активацию МАП киназ и продукцию цитокинов (Рис. 3д) (Toshchakov et al., 2007, 2011). Действие **4ВВ** было гораздо менее выражено в отношении активации МАП киназ и продукции цитокинов, индуцированных агонистами TLR2, ди- и три-пальмитоилированными липопептидами (Рис. 3е) (Toshchakov et al., 2007, 2011).
- **α-спираль С** – центральная из 3-х спиралей, прилегающих к выпуклой стороне β-листа. Пептид **5R667** (из адаптер-связывающего сайта TLR5) представляет наиболее охарактеризованный пептид этой группы. Этот БП, помимо ингибирования функции рецептора-прототипа, также ингибировал функции TLR4, TLR2 и TLR9 (Javmen et al., 2023). Также ингибиторной активностью в отношении рецепторов-прототипов обладали и пептиды из структурно гомологичной области TLR4 и TLR7, однако ингибиторное действие этих пептидов было менее выражено (Toshchakov et al., 2011; Javmen et al., 2020).
- **α-спираль D** – также расположена на выпуклой стороне β-листа. Выраженной ингибиторной активностью обладали пептиды этой области TIR доменов TLR2 (пептид **2R9**), TLR4 (**4R9**), TLR7 (**7R9**) и TLR9 (**9R9**) (Piao et al., 2015; Toshchakov et al., 2011; Javmen et al., 2020, 2018).
- **β-тяж Е и прилегающая к нему α-спираль Е** – β-тяж Е формирует край листа, противоположный β-тяжу В. Пептиды, включающие β-тяж Е TIR доменов TLR1 и TLR6, ингибировали сигнал гетеродимеров TLR2/1 и TLR2/6 (Piao et

al., 2016); также ингибиторной активностью в отношении рецепторов-прототипов обладали сегменты, соответствующие α -спиралям E TIR доменов TLR4, TLR5, TLR7 и TLR9 (Toshchakov et al., 2011; Javmen et al., 2023, 2020, 2018).

Ингибиторные пептиды, идентифицированные в скринингах библиотек TIR доменов рецепторов, различались в специфичности в отношении отдельных членов семейства TLR. Например, пептид **2R9**, представляющий петлю DD и α -спираль D TIR домена TLR2, продемонстрировал широкую специфичность, эффективно блокируя не только TLR2, но и TLR4, TLR7 и TLR9 (Piao et al., 2015). Аналогичным мультиспецифическим действием обладал и пептид **7R9**, происходящий из структурно гомологичного сегмента TLR7 (Javmen et al., 2020). Напротив, пептид **9R34** был специфичен в отношении своего рецептора-прототипа и не ингибировал TLR2, TLR4 или TLR7 (Javmen et al., 2018).

Таблица 1 — Последовательности, специфичность связывания и классификация упомянутых в автореферате ингибиторных пептидов¹

1. №	2. Пептид	3. TIR-прототип	4. Регион TIR домена	5. Последовательность пептида	6. Ингибируемые TLR	7. Верифицированные партнёры по связыванию	8. Сайт TIR-TIR взаимодействия
1	4BB	TLR4	β B, BB, и α B	<i>Pen</i> ² -LHYRDFIPGVAIAA	TLR2, TLR4 ³	TLR4	Сайт 1
2	9R34	TLR9	AB, β B, BB	<i>Pen</i> -GRWALRLCLEERD	TLR9	—	
3	9R34- Δ N	TLR9	AB, β B, BB	<i>Pen</i> -ALRLCLEERD	TLR9	TLR9, TIRAP	
4	TR3	TIRAP	α A, AB, β B	<i>Pen</i> -EGSQASLRCF	TLR2, TLR4	—	
5	TM4	TRAM	BB, α B	<i>Pen</i> -IVFAEMPCGRLHLQ	TLR4	—	
6	TM4- Δ C	TRAM	BB, α B	<i>Pen</i> -IVFAEMPCG	TLR4	—	

¹ Полный список протестированных пептидов и их ингибиторные свойства представлены в Таблицах 1 и 3 диссертации.

² *Pen* – пенетратин, пептидный вектор (RQIKIWFQNRRMKWKK)

³ – жирным шрифтом выделены TLR, в отношении которых ингибиторная активность указанного пептида подтверждена в экспериментах *in vivo*.

1	2	3	4	5	6	7	8
7	TF4	TRIF	BB, α B	<i>Pen</i> -CEEFAQVPGRGELH	TLR4	TLR4	Сайт 1
8	TR5	TIRAP	α B, BC	<i>Pen</i> -ELCQALSRSHCR	TLR4	–	Сайт 2
9	TF5	TRIF	α B, BC	<i>Pen</i> -CLQDAIDHSGFT	TLR4	TLR4, TRAM	
10	TR6	TIRAP	CC, α C	<i>Pen</i> -PGFLRDPWCKYQML	TLR2, TLR4	MyD88	
11	TR667	TIRAP	α C''	<i>Pen</i> -WCKYQMLQALTE	TLR4, TLR5	TLR5, TIRAP, MyD88	
12	5R667	TLR5	α C''	<i>Pen</i> -WCLEAFSYAQGR	TLR2, TLR4 , TLR5, TLR9	TLR5, TIRAP, MyD88	
13	TM6	TRAM	α C, CD	<i>Pen</i> -ENFLRDTWCNFQFY	TLR4	-	Сайт 3
14	2R9	TLR2	DD, α D	<i>Pen</i> -PQRFCKLRKIMNT	TLR2, TLR4, TLR7, TLR9	TIRAP	
15	4R9	TLR4	α D	<i>Pen</i> -LRQQVELYRLLSR	TLR2, TLR4	TIRAP	
16	7R9	TLR7	α D	<i>Pen</i> -FLQLRKRLCGSS	TLR2, TLR4, TLR7, TLR9	TIRAP	Сайт 3
17	9R9	TLR9	DD, α D	<i>Pen</i> -RYVRLRQRLCRQS	TLR9	–	
18	TR9	TIRAP	DD, α D, DE, β E	<i>Pen</i> -AAYPPELRFMYVVD	TLR4	TLR2	
19	4 α E	TLR4	α E	<i>Pen</i> -HIFWRRLKNALLD	TLR4	TLR4	Сайт 4
20	7R11	TLR7	α E	<i>Pen</i> -PYFWQCLKNALATD	TLR7	TIRAP, MyD88	
21	9R11	TLR9	α E	<i>Pen</i> -RSFWAQLGMALTRD	TLR9	TLR9, TIRAP, MyD88	
22	TR11	TIRAP	α E	<i>Pen</i> -GGFYQVKEAVIHY	TLR4	-	

2.3. Скрининг пептидных библиотек TIR доменов адаптерных белков

Дополнительные ингибиторы были идентифицированы при изучении библиотек адаптерных белков. Ингибиторные свойства обнаруживались у

пептидов, происходящих из регионов, структурно гомологичных описанным выше ингибиторным районам TLR (Рис. 3, 4).

TIRAP пептиды: Выраженное ингибиторное действие в отношении TLR4 было обнаружено у пептидов **TR3** (петля AB), **TR5** (α -спираль B), **TR6** (α -спираль C), **TR9** (α -спираль D) и **TR11** (α -спираль E) (Рис. 4а, в, г) (Couture et al., 2012; Javmen et al., 2023). Пептиды **TR3** и **TR6** (а также аналог последнего **TR667**), представляющие соответственно петлю AB и α -спираль C TIR домена TIRAP, эффективно блокировали передачу сигнала как с TLR2, так и с TLR4 (Рис. 4б) (Couture et al., 2012; Javmen et al., 2023).

TRAM пептиды: Пептиды **TM4** и **TM6**, происходящие, соответственно, из петли BB и α -спирали C TIR домена адаптера TRAM блокировали TLR4-зависимое фосфорилирование сигнальных белков и экспрессию цитокинов, причём оба пептида ингибировали цитокины, активируемые посредством как MyD88-, так и TRIF-зависимого сигнального пути (Piao et al., 2013b).

TRIF пептиды: Пептиды **TF4** и **TF5**, представляющие петлю BB и α -спираль B соответственно, продемонстрировали высокую эффективность в блокировании TLR4, причём **TF5** преимущественно ингибировал TRIF-зависимый сигнальный путь (Piao et al., 2013a).

Обобщая результаты скрининга пептидных библиотек, можно констатировать, что, как в рецепторных, так и в адаптерных библиотеках, ингибиторные пептиды с высокой частотой обнаруживались в 4 сайтах, два из которых (сайты 1 и 4) располагаются в районах краевых тяжей β -листа, причём, в случае рецепторных доменов, сайт 1 мог включать частично структурированный сегмент, соединяющий TIR с трансмембранным участком (Рис. 3в). Два других сайта (сайты 2 и 3) формируются α -спиралями B, C и D (Рис. 3в).

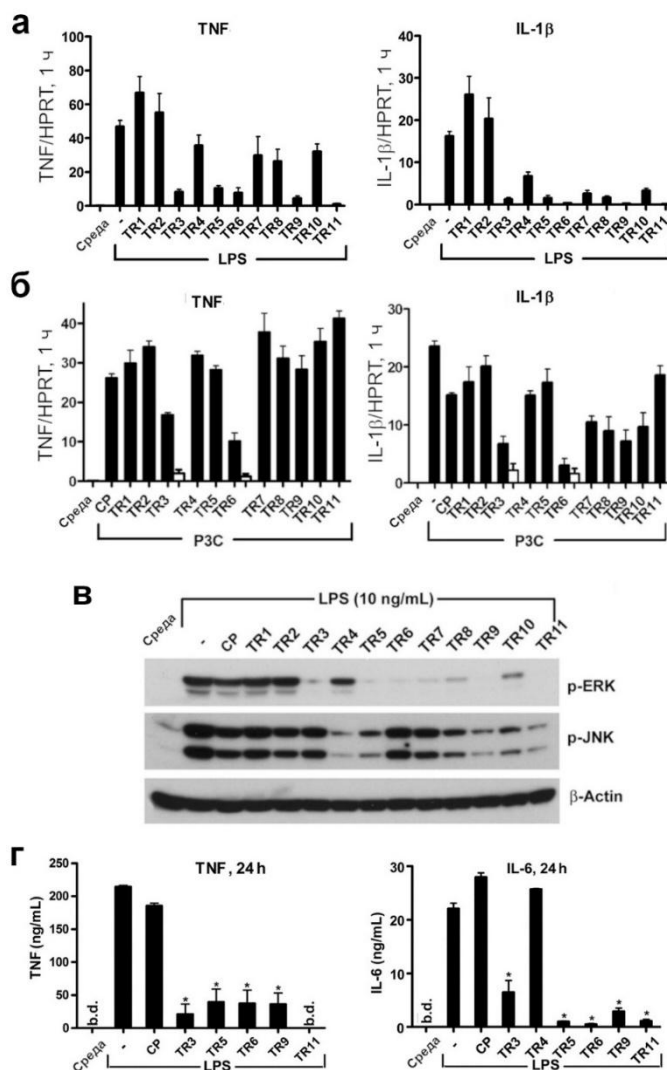


Рисунок 4 — Влияние пептидов библиотеки адаптера TIRAP на TLR-индуцированную активацию перитонеальных макрофагов мышей

а – влияние пептидов на экспрессию *Tnf* и *Il-1 β* через час после стимуляции TLR4

б – влияние пептидов в концентрации 20 (черные столбцы) и 40 мкМ (белые столбцы) на экспрессию *Tnf* и *Il-1 β* , измеренную через час после стимуляции клеток агонистом TLR2

в – влияние пептидов библиотеки TIRAP на активацию МАП киназ через 30 минут после стимуляции клеток LPS

г – влияние пептидов библиотеки TIRAP на содержание провоспалительных цитокинов в супернатантах через 24 часа после стимуляции LPS (Couture et al., 2012).

3. Механизм действия БП: специфичность и аффинность взаимодействия БП с TIR доменами в культивируемых клетках и *in vitro*

Концепция блокирующих пептидов (БП) основывается на предположении, что БП в значительной степени воспроизводят специфичность и аффинность взаимодействия соответствующего сайта полноразмерного белка-прототипа.

Выполненные скрининги пептидных библиотек идентифицировали множество ингибиторных пептидов, происходящих из различных областей TIR доменов. Результаты функциональной оценки действия идентифицированных пептидов (в частности их специфичность в отношении различных членов семейства TLR), однако, могли лишь косвенно указать на то, какой из TIR доменов является мишенью конкретного пептида. С целью идентификации доменов, связываемых отдельными пептидами, а также экспериментального подтверждения предполагаемого механизма действия БП, заключающегося в связывании TIR доменов, была разработана оригинальная методика для детекции TIR-пептидного связывания непосредственно в клетках. Разработанная методика основывалась на Фёрстеровском резонансном переносе энергии (FRET) и предусматривала эктопическую экспрессию в клетках панели TIR доменов, слитых с флуоресцентным белком, используемым в качестве донора флуоресценции. В качестве акцептора флуоресценции использовались БП, меченные органическим красителем, способным поглощать флуоресценцию меченого TIR домена. Свидетельством прямого связывания TIR домена с тестируемым пептидом служило тушение флуоресценции белковой метки при инкубации клеток в присутствии флуоресцентно меченого пептида. Важными аспектами методики являлось то, что исследование проводилось на живых клетках, экспрессирующих панель потенциальных мишеней, а также то, что обнаружение тушения проводилось по снижению времени жизни флуоресценции, а не по её интенсивности. Обнаружение переноса энергии по времени жизни флуоресценции сделало возможным надёжную детекцию тушения в условиях высокой гетерогенности экспрессии мишеней в отдельных клетках, типичной для транзиторной экспрессии трансгенов.

3.1. FRET-система для оценки TIR-пептидного связывания в клетках

Разработанный подход количественной оценки TIR-пептидного связывания включал в себя следующие этапы:

- транзиторную экспрессию в клетках HeLa панели TIR доменов, слитых с флуоресцентным белком Cerulean (Cer) (донор флуоресценции);
- инкубацию клеток, экспрессирующих ту или иную TIR-Cer конструкцию, в присутствии БП, меченного акцептором флуоресценции белковой метки (Bodipy-TMR-X (BTX) или Cy3);
- измерение времени жизни флуоресценции донора методом микроскопии.

Рисунок 5 показывает результаты анализа времени затухания флуоресценции экспрессирующих TLR4-Cer клеток в присутствии флуоресцентного пептида **BTX-4BB** методом высокочастотной спектроскопии флуоресценции (при этом методе интенсивность возбуждающего света модулируется по амплитуде с варьируемой частотой). Данные показали, что пептид **BTX-4BB** вызывает как снижение модуляции флуоресценции TLR4-Cer, так и возрастание фазового сдвига между пиками возбуждения и эмиссии, что однозначно свидетельствует о снижении времени жизни флуоресценции донора вследствие FRET (Рис. 5). Эти наблюдения указали на наличие прямого взаимодействия донора (TIR домена TLR4) и акцептора (пептида **4BB**) непосредственно в клетках и подтвердили функциональность предложенной системы (Toshchakov et al., 2011).

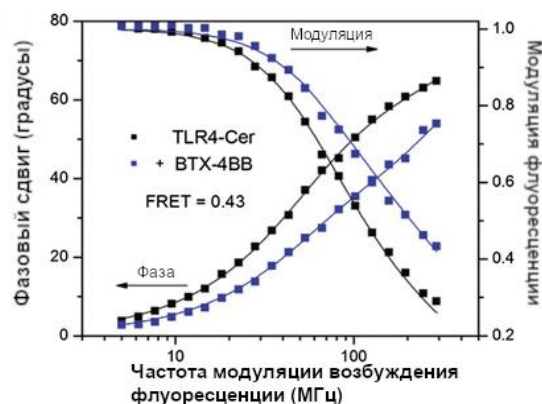


Рисунок 5 — Тушение флуоресценции TLR4-Cer в присутствии флуоресцентно меченого пептида **BTX-4BB** (Toshchakov et al., 2011)

3.2. Демонстрация специфичности TIR-пептидного связывания

Эксперименты с использованием разработанной FRET-системы по характеристике связывания в различных парах TIR-пептид продемонстрировали,

что БП действительно связывают TIR домены в клетках, причем связывание (тушение флуоресценции конструкций TIR-Cer) наблюдается в том же диапазоне концентраций пептидов, что и ингибирование функции TLR в функциональных тестах (Рис. 3–6). В частности, рисунок 6 представляет результаты анализа связывания пептида **2R9** с TIR доменами TIRAP, TLR1 и MyD88. Инкубация клеток, экспрессирующих TIRAP-Cer, в присутствии **BTX-2R9** вызывала значительное снижение времени жизни флуоресценции клеток, выражающееся в увеличении фракционной амплитуды короткоживущего компонента, тогда как эффект тех же концентраций **BTX-2R9** на флуоресценцию TLR1-Cer был значительно меньше (Рис. 6а и 6б). Влияние **BTX-2R9** на флуоресценцию MyD88-Cer было минимальным (Рис. 6а–в). Важно отметить, что **BTX-2R9** не вызывал значимых изменений во времени жизни флуоресценции экспрессируемого в клетках Cer, не связанного с каким-либо TIR доменом (Рис. 6в).

Некоторые пептиды, например, 5R667, демонстрировали мультиспецифичность, связываясь с несколькими TIR доменами со сходным сродством (Javmen et al., 2023).

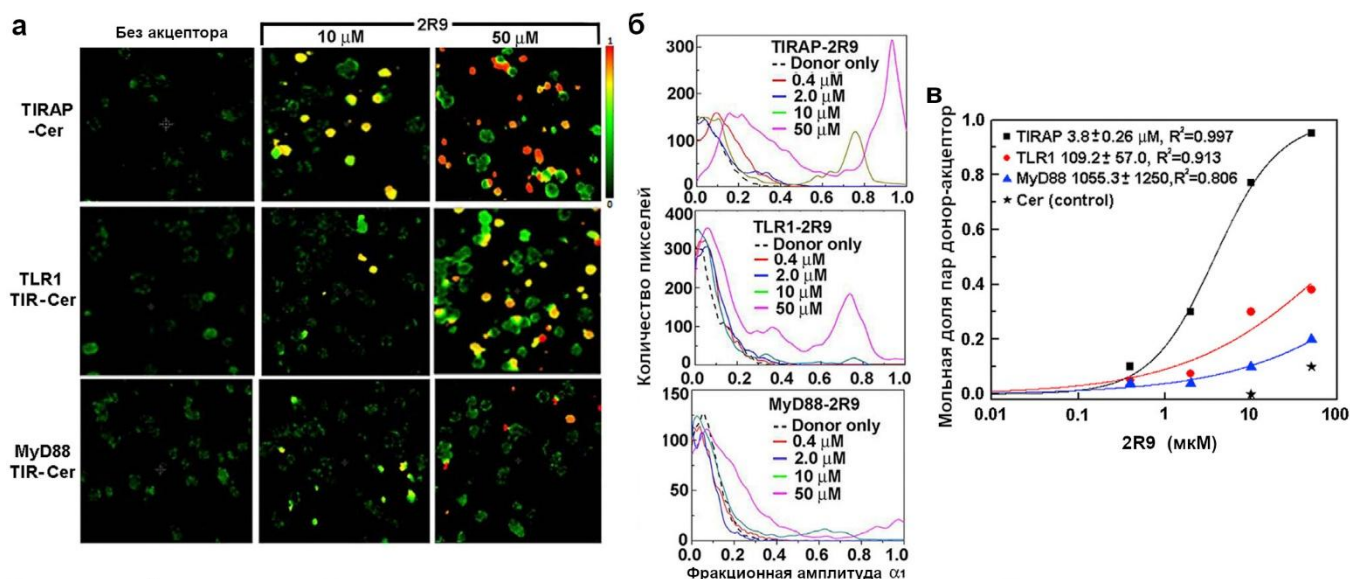


Рисунок 6 — Анализ взаимодействия пептида **2R9** с экспрессируемыми в клетках TIR доменами белков, взаимодействующих с активированным TLR2, методом FLIM (Piao et al., 2015)

а — FLIM изображения клеток, экспрессирующих TIRAP-Cer, TLR1-Cer или MyD88-Cer, в присутствии различных концентраций пептида **2R9** и без пептида. Затухание флуоресценции

анализировали, используя двухкомпонентную модель с временами жизни компонентов $\tau_1=0,9$ нс и $\tau_2=2,96$ нс. Изображения показывают фракционную амплитуду α_1 короткоживущего компонента флуоресценции – параметр, отражающий долю связанных с акцептором доноров. Изображения получали и анализировали, используя FLIM систему Альба 5 с пакетом программного обеспечения VistaVision Suite (ISS, Champaign, IL)

б – гистограмма встречаемости пикселей с различной фракционной амплитудой короткоживущего компонента флуоресценции Cer (α_1) в изображениях HeLa клеток, экспрессирующих TIRAP-Cer, TLR1-Cer и MyD88-Cer, в присутствии различных концентраций пептида **BTX-2R9**

в – зависимость доли донор-акцепторных пар от концентрации акцептора для Cer, экспрессируемого в связке с различными TIR доменами, а также Cer не конъюгированного с TIR доменом. Количество донор-акцепторных пар оценивали, исходя из характеристических значений α_1 в присутствии различных концентраций **BTX-2R9**.

Предложенная FRET система была применена для сравнительного анализа связывания широкого спектра наиболее активных БП с TIR доменами, являющимися их потенциальными мишенями. Эксперименты продемонстрировали специфичный характер TIR-пептидного связывания, выявив существенные различия в сродстве различных пар. Например:

- Пептид **2R9** (из TLR2) демонстрировал высокое сродство связывания с в паре **2R9-TIRAP**, тогда как сродство связывания **2R9** с TIR доменами TLR1 или TLR7 было существенно ниже (Рис. 6). Не детектировалось связывания пептида **2R9** с Cer, не слитым с TIR доменом (Рис. 6в) или слитым с TIR доменом TLR9 (Piao et al., 2015).
- Пептид **9R34-ΔN** (из TLR9) проявлял высокую специфичность к TIR домену TLR9 (Javmen et al., 2018).
- Пептид **4BB** (из TLR4) демонстрировал высокое сродство к TIR домену TLR4 (Рис. 5е) (Toshchakov et al., 2011; Szmackinski et al., 2014).

Взаимодействие в паре **2R9-TIRAP** также изучали в бинарной системе *in vitro* с использованием рекомбинантного TIR домена TIRAP. Использовали методы анизотропии флуоресценции (АФ) и поверхностного плазмонного резонанса. Оба метода подтвердили высокое сродство связывания в паре **2R9-TIRAP**, причём, как показали данные АФ, кажущаяся константа диссоциации в бинарной системе *in*

vitro (~40 нМ) была приблизительно на 2 порядка ниже кажущейся константы диссоциации в клеточной системе (2–4 мкМ) (Piao et al., 2015). Такое несоответствие объяснялось различиями между внеклеточной и внутриклеточной концентрациями проникающего пептида, а также вероятным неспецифическим и нефункциональным связыванием пептида с протеомом клетки. Специфичность связывания пептида **2R9** с TIR доменом-мишенью подтверждалась и тем, что кажущаяся константа связывания в паре **2R9**-альбумин была в ~40 раз ниже константы связывания пары **2R9**-TIRAP (Piao et al., 2015).

4. Оценка системного влияния БП на TLR в экспериментах *in vivo*

4.1. Ингибирование системной индукции цитокинов

Способность биологических агентов модулировать ту или иную функцию *in vivo*, не оказывая при этом существенного влияния на жизненно важные функции организма, является убедительным доказательством специфичности действия исследуемого агента и демонстрирует перспективность его дальнейшей разработки для применения в медицине и ветеринарии. С целью более детальной характеристики свойств идентифицированных ингибиторных пептидов, наиболее эффективные из них были протестированы на способность подавлять системную активацию цитокинов *in vivo*, индуцированную введением мышам агонистов TLR. Эксперименты показали, что многие ингибиторные пептиды, идентифицированные в тестах *in vitro* эффективно подавляли продукцию провоспалительных цитокинов (TNF, IL-6, IL-12), индуцированную введением агонистов различных TLR (Рис. 7).

В частности, было показано, что пептиды **TR5** и **TR6** (библиотека TIRAP) существенно снижали уровни циркулирующих TNF и IL-6 после введения мышам нелетальной дозы LPS (Рис. 7а) (Couture et al., 2012). LPS-индуцированные уровни провоспалительных цитокинов также достоверно снижались ингибиторными пептидами библиотек адаптеров TRAM и TRIF, пептидами **TM4**, **TM6**, **TF4** и **TF5**, причём ингибиторные пептиды были эффективны как при интраперитонеальном,

так и, в несколько меньшей степени, при внутривенном введении (Piao et al., 2013a; 2013b). Пептид **2R9**, подтверждая полученные на культивируемых макрофагах данные о его мультиспецифическом действии в отношении различных TLR, эффективно ингибировал цитокины, индуцированные введением мышам как агониста TLR2 (Pam3C), так и агониста TLR9 (ODN1668) (Рис. 7б, в) (Piao et al., 2015). Пептид **9R34-ΔN** (библиотека TLR9), напротив, демонстрировал специфичность действия, блокируя цитокиновый ответ при стимуляции TLR9 (Рис. 7в), но не блокировал ответ на агонист TLR2 (Рис. 7б) (Javmen et al., 2018). Пептид **7R11** (библиотека TLR7) подавлял системную индукцию цитокинов, вызванную введением мышам резихимода (агонист TLR7 и TLR8) (Javmen et al., 2020).

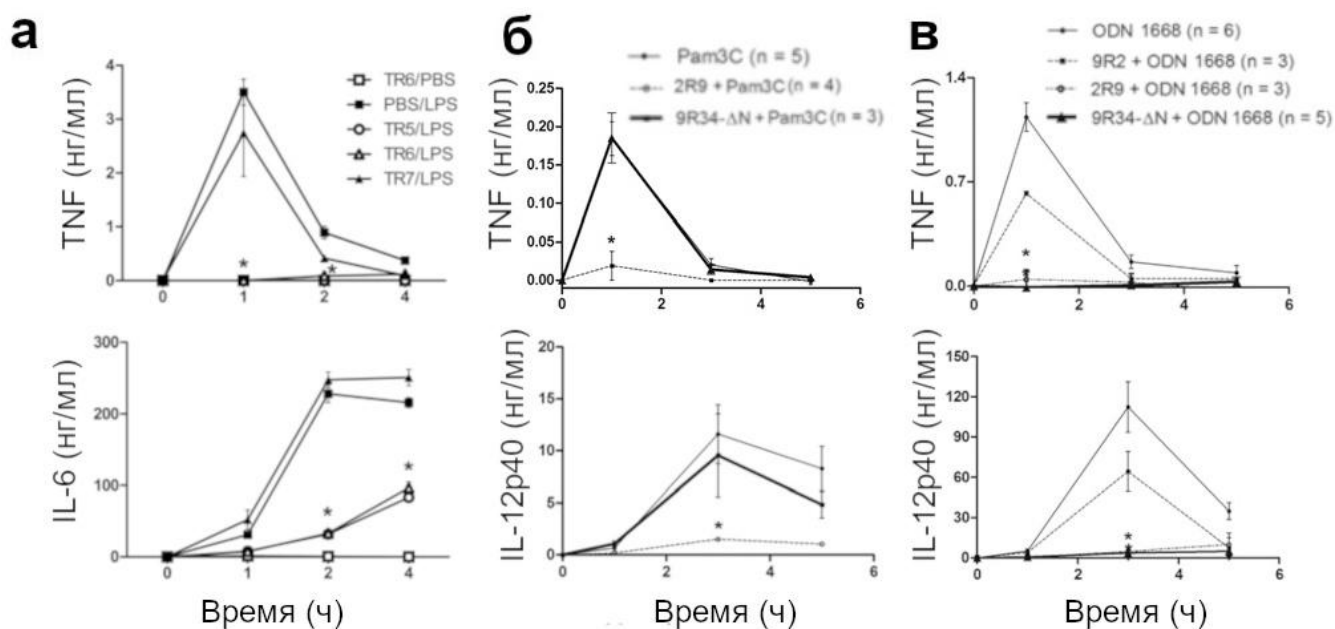


Рисунок 7 — Влияние БП на динамику циркулирующих цитокинов, индуцированных агонистом TLR4 (LPS) (а), TLR2 (Pam3C) (б) или TLR9 (ODN1668) (в) (Couture et al., 2012; Javmen et al., 2018)

а – Пептиды библиотеки адаптера TIRAP, **TR5** и **TR6**, но не инертный пептид **TR7**, достоверно снижают LPS-индуцированные уровни циркулирующих TNF и IL-6.

б – Пептид **2R9**, но не TLR9-специфичный пептид **9R34-ΔN**, снижает системные уровни TNF и IL-12p40, индуцированные введением липопептида-агониста TLR2.

в – Оба пептида, мультиспецифичный пептид **2R9**, и TLR9-специфичный пептид **9R34-ΔN**, но не инертный пептид **9R2**, ингибируют циркулирующие TNF и IL-12p40, индуцированные ip инъекцией мышам иммуностимуляторного олигонуклеотида ODN1668.

LPS, Pam3C и ODN1668 вводились мышам линии C57BL/6J *ip* в дозах 1 мкг/г, 67 и 7,86 нмоль, соответственно, через час после *ip* введения указанного пептида в дозе 10 нмоль/г.

4.2. Предотвращение TLR-индуцированной смертности

БП дополнительно были протестированы в экспериментах на мышах на способность предотвращать гибель, вызванную системной активацией TLR. Использовались экспериментальные модели, в которых смертность индуцировалась следующими способами:

1. высокими дозами LPS (летальная модель септического шока)
2. агонистами TLR в сочетании с D-галактозамином (D-гал) (модель острой печёночной недостаточности)
3. инфицированием вирусом гриппа (модель вирусной инфекции).

Выполненные эксперименты убедительно подтвердили способность БП предотвращать TLR-индуцированную гибель в экспериментах на мышах. Так,

- пептиды библиотек TIRAP и TRAM существенно снижали смертность от LPS-индуцированного шока, причём однократное профилактическое введение пептида **TM4**, или его более короткой версии **TM4-ΔC**, обеспечивало выживание 100% животных, получивших летальную дозу LPS (Рис. 8а).
- Пептид **9R34-ΔN** (как было показано в экспериментах на культуре макрофагов, этот пептид эффективно и специфически ингибирует TLR9) в 100% случаев предотвращал гибель, индуцированную введением мышам 3,93 нмоль ODN1668 в сочетании с D-гал (Рис. 8б). TLR4-специфичный пептид **TM4** был менее эффективен в защите животных при индукции гибели агонистом TLR9. **TM4** снижал ODN1668-индуцированную смертность до ~60% в этих экспериментах (Рис. 8б). Неполная защита, оказываемая ингибитором TLR4 против TLR9-индуцированной гибели, объяснялась блокированием действия эндогенных индукторов воспаления, образующихся при первичном воспалительном повреждении и называемых в англоязычной литературе

DAMP (damage-associated molecular patterns), которые в значительной мере оказывают своё провоспалительное действие, активируя TLR4. Защитное действие пептидов, однако, снижалось при двукратном увеличении дозы ODN1668 (Рис. 8в) (Javmen et al., 2018).

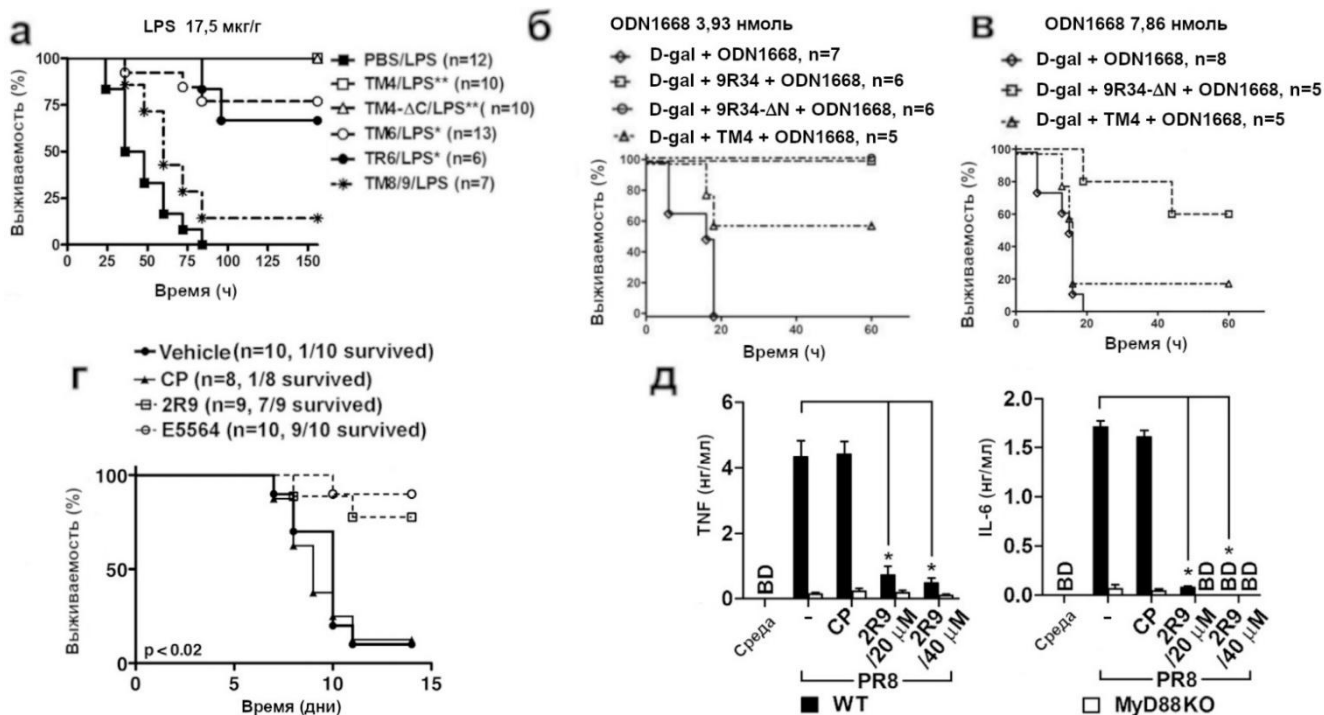


Рисунок 8 — БП способны предотвращать смертность мышей линии C57BL/6J, вызванную введением агонистов TLR (а–в) или инфицированием штаммом вируса гриппа H1N1 A/PR/8/34 (PR8) (г), а также подавлять MyD88-зависимую продукцию цитокинов культивируемыми перитонеальными макрофагами, инфицированными PR8 (д)

а – Пептиды библиотеки адаптера TRAM, **TM4** и **TM4-ΔC**, но не инертный пептид **TM8**, предотвращали смертность, индуцированную введением LPS (17,5 мкг/г), тогда как пептиды **TM6** и **TR6** защищали частично (Piao et al., 2013b)

б, в – Влияние пептида **9R34** и его более короткой версии **9R34-ΔN** на смертность мышей, индуцированную введением D-гал в комбинации с ODN1668 (Javmen et al., 2018)

г – Пептид **2R9** улучшает выживаемость мышей, инфицированных вирусом гриппа. Мыши получали интраназальный инокулят вируса в дозе ~7,500 TCID₅₀ (tissue culture infectious dose 50%), что вызывало ~90%-ю смертность в контрольной группе (LD₉₀). Начиная со второго дня после инокуляции, мыши получали пятидневный курс ежедневных инъекций пептида **2R9** (200 нмоль), контрольного пептида (**CP**) (200 нмоль), ингибитора TLR4 липидной природы Эриторана (E5564) (200 мкг) или PBS (Piao et al., 2015)

д – Влияние пептида **2R9** на продукцию цитокинов перитонеальными макрофагами мышей линии C57BL/6J дикого типа (чёрные столбцы) или мышей с нокаутом MyD88 (белые столбцы), инфицированными вирусом гриппа (Piao et al., 2015). Клетки инкубировались в присутствии вируса в дозе 1 MOI в течении 2-х часов в стандартных условиях. По истечении инкубации с

вирусом, среда культивации заменялась на свежую пептид-содержащую или контрольную среду. Содержание цитокинов в супернатантах измеряли через 24 часа после инфицирования клеток.

LPS и ODN1668 вводились мышам линии C57BL/6J *ip* в дозах 17,5 мкг/г (**а**), 3,93 (**б**) и 7,86 (**в**) нмоль через час после *ip* введения пептидов в дозе 10 нмоль/г.

В экспериментах по оценке способности пептидных ингибиторов TLR снижать смертность при острых вирусных инфекциях использовали пептид 2R9. Этот пептид был выбран, поскольку он оказывал мультиспецифическое ингибирование TLR, подавляя функцию TLR2, TLR4, TLR7 и TLR9 за счёт связывания адаптерного белка, общего для этих рецепторов. Пептид 2R9 снижал смертность инфицированных вирусом гриппа мышей с 90% до ~20% (Рис. 8г). Изучение механизма защитного действия пептида 2R9 показало, что 2R9 блокирует MyD88-зависимую продукцию провоспалительных цитокинов вирус-инфицированными макрофагами (Рис. 8д). Эксперименты с вирусом гриппа показали, что БП способны модулировать повреждающее воспаление при острых инфекциях (Piao et al., 2015).

5. Идентификация функциональных сайтов связывания TIR доменов посредством анализа эволюционной сохранности

5.1. Байесова классификация TIR доменов

Ортологичные белки способны сохранять предковые функции на протяжении сотен миллионов лет эволюционной истории. Эта способность, вместе с происходящим в последние два десятилетия быстрым ростом числа известных белковых последовательностей, позволяет выявление функционально значимых мотивов методами биоинформатики на основании анализа вариабельности аминокислотных последовательностей белков-ортологов. Для выявления эволюционно сохранных мотивов, характеризующих функционально специализированные группы TIR доменов, нами был проведён крупномасштабный биоинформатический анализ последовательностей TIR доменов, присутствующих в публичных базах данных на момент исследования. С помощью программы MAPGAPS нами было обнаружено более 26,000 уникальных TIR доменов и

построено выравнивание их последовательностей. Полученная аминокислотная матрица была проанализирована с помощью программного пакета BPPS, с помощью которого была построена иерархическая классификация TIR доменов на основе программно обнаруживаемых мотивов, наиболее отличающих каждую из групп иерархии от остальных групп, и выявлены мотивы последовательностей, характерные для каждой из 58 идентифицированных групп и подгрупп иерархии (Toshchakov & Neuwald, 2020) (Рис. 9).

Первичный анализ состава групп и подгрупп полученной иерархии подтвердил, что отдельные группы объединяют функционально сходные белки. Так, каждая из трёх наиболее крупных групп иерархии (группы 2, 3 и 4) была сформирована TIR доменами отдельного семейства эукариотических белков, имеющих характерную доменную архитектуру и общую биологическую функцию (Рис. 9а). Так, группа 2 содержала несколько подгрупп, каждая из которых включала N-концевые TIR домены NOD-подобных рецепторов высших растений. Группа 3 была образована доменами Толл белков артропод и Толл-подобными рецепторами других типов животных, тогда как группа 4 включала TIR домены белков семейства рецептора IL-1 (Рис. 9в). Важно отметить, что, подобно родительским группам, подгруппы групп 3 и 4 были образованы представителями отдельных подсемейств белков. Например, группа 3.4 объединяла TIR домены TLR5 различных видов животных, а группа 4.4 включала исключительно TIR домены главной цепи рецептора IL-18 (Рис. 9в). Некоторые из подгрупп, однако, содержали представителей нескольких подсемейств. Например, группа 3.2 включала в себя TIR домены TLR2, а также домены TLR, которые функционируют как гетеродимеры с TLR2 – это TIR домены TLR1, TLR6 и TLR10 (Рис. 9в).

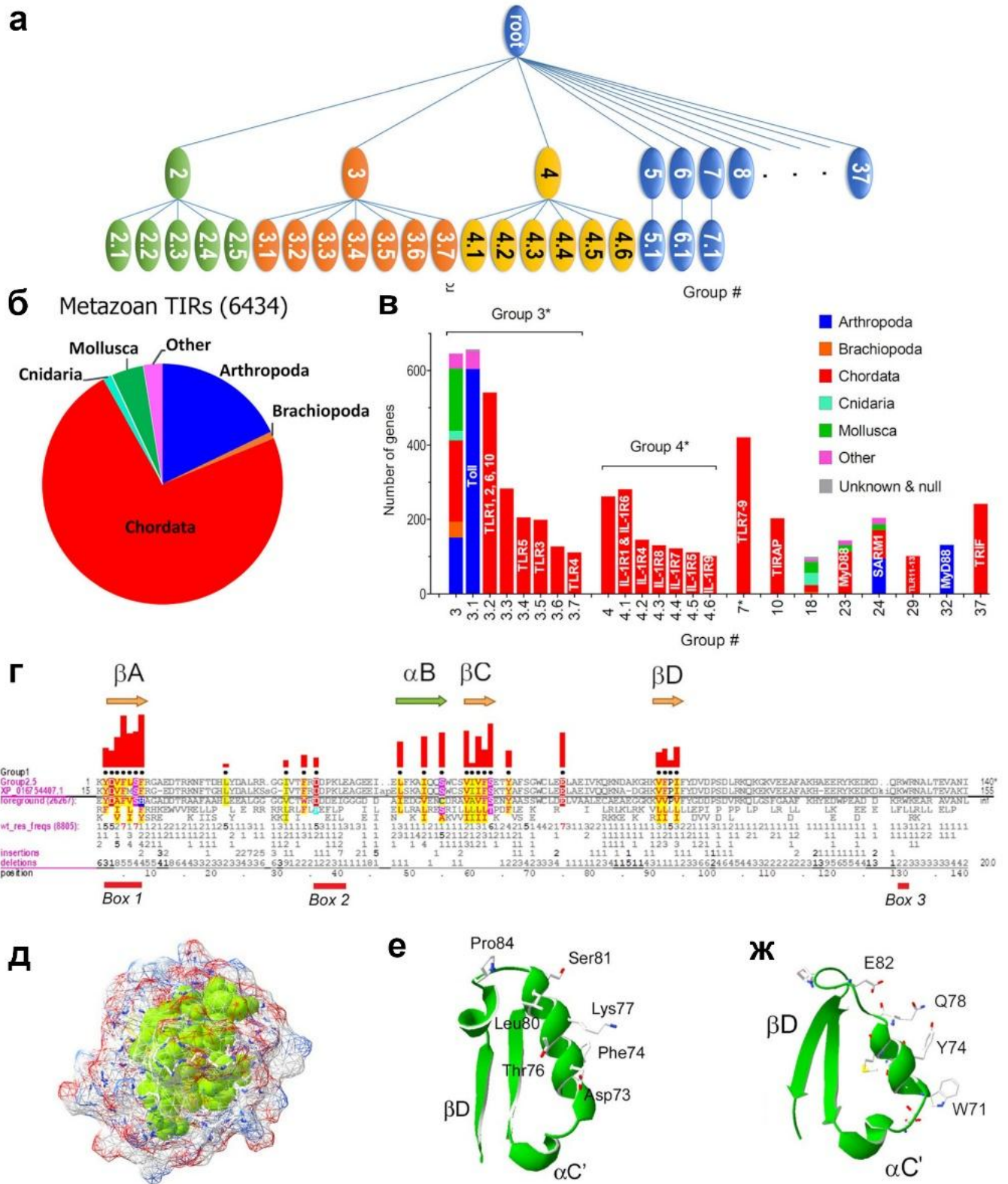


Рисунок 9 — Иерархическая классификация TIR доменов и некоторые характерные особенности отдельных классов иерархии

а – Иерархическая классификация TIR доменов. Наиболее крупные группы иерархии, группы 2, 3 и 4, образованы TIR доменами функционально и структурно сходных белков: NLR (NOD-like

receptors) растений (группа 2), рецепторами Толл и Толл-подобными рецепторами (группа 3), и рецепторами семейства IL-1R (группа 4) (Toshchakov & Neuwald, 2020)

б, в – Представительство основных типов метазой в общем пуле (**б**) и в отдельных группах TIR доменов животных (**в**)

г – Контрастное выравнивание, показывающее аминокислотные остатки, характерные для корневой группы иерархии (всех TIR доменов). Черные кружки поверх последовательностей указывают 25 позиций, наиболее отличающих TIR домены от остального протеома. Высота красных столбцов показывает в относительных единицах эволюционное давление (selective constraint), оказываемое на отдельные позиции мотива (Neuwald et al., 2003; Toshchakov & Neuwald, 2020). Две приведённые в качестве примера последовательности выравнивания показывают консенсусную и одну из последовательностей выбранной группы. Следующие три ряда указывают аминокислотные остатки, наиболее часто встречающиеся в каждой из позиций, а три ряда цифр под ними показывают соответствующие частоты встречаемости для каждого из аминокислотных остатков в десятках процентов. Например, из представленного выравнивания можно видеть, что тирозин во второй позиции встречается в 50–60% всех TIR доменов. Горизонтальными стрелками над последовательностями указаны элементы вторичной структуры, образуемые аминокислотными остатками TIR-специфического мотива. Более подробно формат контрастных выравниваний и принципы их построения описаны в публикациях (Neuwald, 2003, 2014a, 2014c; Toshchakov & Neuwald, 2020).

д – Аминокислотные остатки общего для TIR доменов мотива формируют сердцевину домена. Аминокислотные остатки TIR-специфического мотива показаны в объёмном формате и выделены зелёным в модели TIR домена рецептора TRR-2 (Toll-related receptor-2) гидры (*Hydra magnipapillata*) (pdb ID: 4W8H).

е – Расположенный в районе третьего спирального участка аминокислотный кластер, характерный для TIR доменов MyD88 (группа 23), имеет последовательность -D₉F₉Q₉T₈K₉F₉A₉-L₇S₈L₉-x-P₉G₉- (подстрочные символы указывают частоту встречаемости аминокислот мотива в последовательностях MyD88 в десятках процентов, с округлением до меньшего; подчёркиванием выделены аминокислотные остатки, боковые цепи которых располагаются на поверхности домена и образуют характерный для группы участок поверхности домена). Пептид, включающий этот участок, ингибировал TLR4 (Piao et al., 2013b).

ж – Расположенный в районе третьего спирального участка аминокислотный кластер, характерный для TIR доменов адаптера TIRAP (группа 10), имеет консенсусную последовательность -W₉C₉-x-Y₉Q₈M₉-x-Q₉A₈L₉-x-E₈- (аминокислотные остатки спирали, расположенные поверхностно в трёхмерной структуре домена, подчёркнуты). БП, включающие этот мотив (пептиды **TR6** и **TR667**), ингибировали TLR (Рис. 4, 7а, 8а) (Couture et al., 2012; Piao et al., 2013b; Javmen et al., 2023).

Представленные наблюдения убедительно показывают, что составляющие иерархию отдельные группы и подгруппы объединяют белки со сходным функционалом. Соответственно, аминокислотные мотивы, характеризующие отдельные группы, в большинстве случаев должны указывать положение функционально значимых сайтов. Дальнейший анализ последовательностей,

который был сфокусирован на TIR доменах, являющихся предметом настоящего исследования – TIR доменах TLR млекопитающих и их адаптерных белков, – подтвердил это заключение.

5.2. Мотивы, общие для всех TIR доменов

С целью идентификации аминокислотных позиций, отвечающих за функциональную специализацию TIR доменов, на первом этапе были выявлены позиции, эволюционно сохраненные во всех TIR доменах. Анализ показал, что эти позиции, в основном, формируют гидрофобное ядро доменов и ответственны за сворачивание белка и поддержание его общей укладки (Рис. 9г, д), тогда как мотивы, характеризующие функционально специализированные группы, чаще располагались на поверхности доменов и могли формировать участки поверхности, определяющие специфичность TIR-TIR взаимодействий.

5.3. Мотивы, характерные для TIR доменов TLR1-6 и TLR10

TIR домены TLR, экспрессирующихся на плазматической мембране, TLR1–6 и TLR10, входили во вторую по величине группу иерархии, группу 3. В эту группу также входили TIR домены рецепторов Toll артропод, которые вместе с доменами TLR других низших метазой образовывали подгруппу 3.1 (Рис. 9в). В группу 3 также входили домены TLR хладнокровных хордовых, не имеющие гомологов в геномах млекопитающих (подгруппы 3.3 и 3.6) (Рис. 9в). Можно отметить, что TIR домены эндосомальных TLR (TLR7–9) не входили в группу 3, а образовывали отдельную группу иерархии, группу 7 (Рис. 9в).

Позиции, специфически сохраненные в TIR доменах группы 3, образовывали 3 кластера аминокислотных остатков. Два кластера располагались в районах β -тяжей, формирующих края β -листа, β -тяги В (β В) и β Е. Наиболее крупный мотив -E₈-(х-х)-х[6]-C₉-х-H₆-х-R₉-D₈-F₇-х-х-G₉- располагался в районе β В, охватывая прилегающие петли, и включал остаток глутаминовой кислоты, располагающийся

на С-конце спирали αA . Другой кластер позиций, характерных для этой группы доменов, обнаруживался в районе, формирующем противоположный к βB край β -листа, в районе тяжа βE . Характерная аминокислотная последовательность этого региона: $-Y_7-I/L_8-x-W_8-P_5-$ (Toshchakov & Neuwald, 2020). Триптофан этого мотива (W121), в контексте известных трёхмерных структур доменов этой группы, находился в π - π взаимодействии Т-типа с ароматическими остатками в позициях 13, 129 и 130, которые, аналогично W121 из βE , также отличались малой межвидовой вариабельностью среди TIR доменов группы 3. Третий мотив, отличающий группу 3 от остальных TIR доменов, включал 3 гидрофобных остатка, располагающихся в участке последовательности между β -тяжами D и E. Два остатка (позиции 110 и 114) располагаются на внутренней стороне α -спирали D (αD), тогда как третий (позиция 99) располагается в петле DD и также обращён к сердцевине домена. Боковые цепи всех трёх остатков контактируют с гидрофобным ядром домена и, по всей вероятности, их присутствие обуславливает характерную для группы 3 перпендикулярную ориентацию четвёртого спирального участка по отношению к тяжам β -листа (Toshchakov & Neuwald, 2020).

Приведённый анализ показывает, что позиции, характеризующие TIR домены данного класса, либо располагаются в функциональных сайтах TIR-TIR связывания, либо определяют локальную укладку полипептидной цепи в регионе, осуществляющем взаимодействия TIR доменов.

5.4. Мотивы, характерные для TIR доменов TLR7-9

TIR домены TLR7–9 формировали отдельную группу иерархии, группу 7. Анализ контрастного выравнивания последовательностей TIR доменов группы 7 показал, что наиболее характерным фрагментом последовательности эндосомальных TLR является участок петли BB, имеющий последовательность $-E_9E_9R_9D_9W_9-x-P_9G_9-$. Семь из восьми позиций этого участка занимают аминокислотные остатки, встречающиеся с частотой $>90\%$ в известных

последовательностях TIR доменов этой группы. БП, соответствующий этому участку последовательности TLR9, пептид **9R34-ΔN**, эффективно блокировал TLR9-индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов в экспериментах на культивируемых клетках и на мышах (Рис. 3г, 7в, 8б, 8в). Другие характерные для эндосомальных TLR мотивы располагались в районах третьей и четвёртой α-спиралей. Пептиды, происходящие из соответствующих сегментов TLR9 (пептиды **9R6** и **9R9**), оказывали умеренное супрессорное действие на индукцию провоспалительных цитокинов агонистом TLR9 (Рис. 3г) (Javmen et al., 2018), а пептиды из соответствующих сегментов TLR7 ингибировали продукцию цитокинов, активированную через TLR7 (Javmen et al., 2020).

5.5. Мотивы, характерные для адаптерных белков

Анализ выявил мотивы, характерные для TIR доменов адаптеров MyD88 и TIRAP, многие из которых располагаются в сайтах, идентифицированных скринингом БП (Toshchakov & Neuwald, 2020). Структурные модели, представляющие MyD88- и TIRAP-специфичные мотивы, располагающиеся в районе третьего спирального участка, показаны на рисунках 10е и 10ж.

6. Комплексная модель взаимодействия TIR доменов

6.1. Топология сайтов TIR-TIR связывания

На основании совокупности данных скрининга пептидных библиотек, FLIM-микроскопии, структурного и биоинформатического анализа была построена комплексная модель взаимодействия TIR доменов при образовании цитоплазматического сигнального комплекса активированными TLR (Рис. 10).

Модель постулирует, что активация TLR ведет к образованию двуцепочечного комплекса, составленного из димера TIR доменов TLR и открытого числа TIR доменов адаптеров. Взаимодействия TIR доменов в комплексе осуществляются

следующими четырьмя сайтами, расположенными в структурно гомологичных районах как TLR, так и их адаптеров (Рис. 10а):

Сайт 1 (S1): Располагается в районе N-концевого краевого β -тяжа (тяж В) и включает прилегающие петли. Этот сайт ответственен за латеральные, внутрицепочечные взаимодействия в первичном комплексе (Рис. 10б).

Сайт 2 (S2): Формируется α -спиралью С (α С) с возможным участием прилегающей α -спирали В.

Сайт 3 (S3): Формируется α -спиралью D вместе с прилегающими петлями. Устанавливает межцепочечные связи TIR доменов в комплексе, реципрочно взаимодействуя с сайтом S2 (Рис. 10б–д).

Сайт 4 (S4): Располагается в районе С-концевого краевого β -тяжа (тяж Е) и включает в себя прилегающие петлю ЕЕ и α -спираль Е. Взаимодействует с S1. Ответственен за продольные, внутрицепочечные взаимодействия в олигомерном комплексе (Рис. 10б–д).

6.2. Механизм сборки сигнального комплекса при активации TLR

Согласно предложенной модели, сборка первичного сигнального комплекса включает в себя следующие этапы:

- взаимодействие агониста с TLR приводит С-концы эктодоменов рецепторов в непосредственную близость друг от друга, что позволяет цитоплазматическим TIR доменам образовать димер (Рис. 10в). Димеризация TIR доменов рецепторов, через взаимодействие сайтов S1–S4, формирует композиционный сайт рекрутирования адаптера, который состоит из сайтов S2 и S3 разных доменов димера (Рис. 10в). Рекрутирование адаптера осуществляется согласно кооперативному механизму взаимодействия, предполагающему, что связываемый TIR взаимодействует одновременно с обоими доменами димера (Рис. 10в). Такое взаимодействие стабилизирует исходный рецепторный димер.

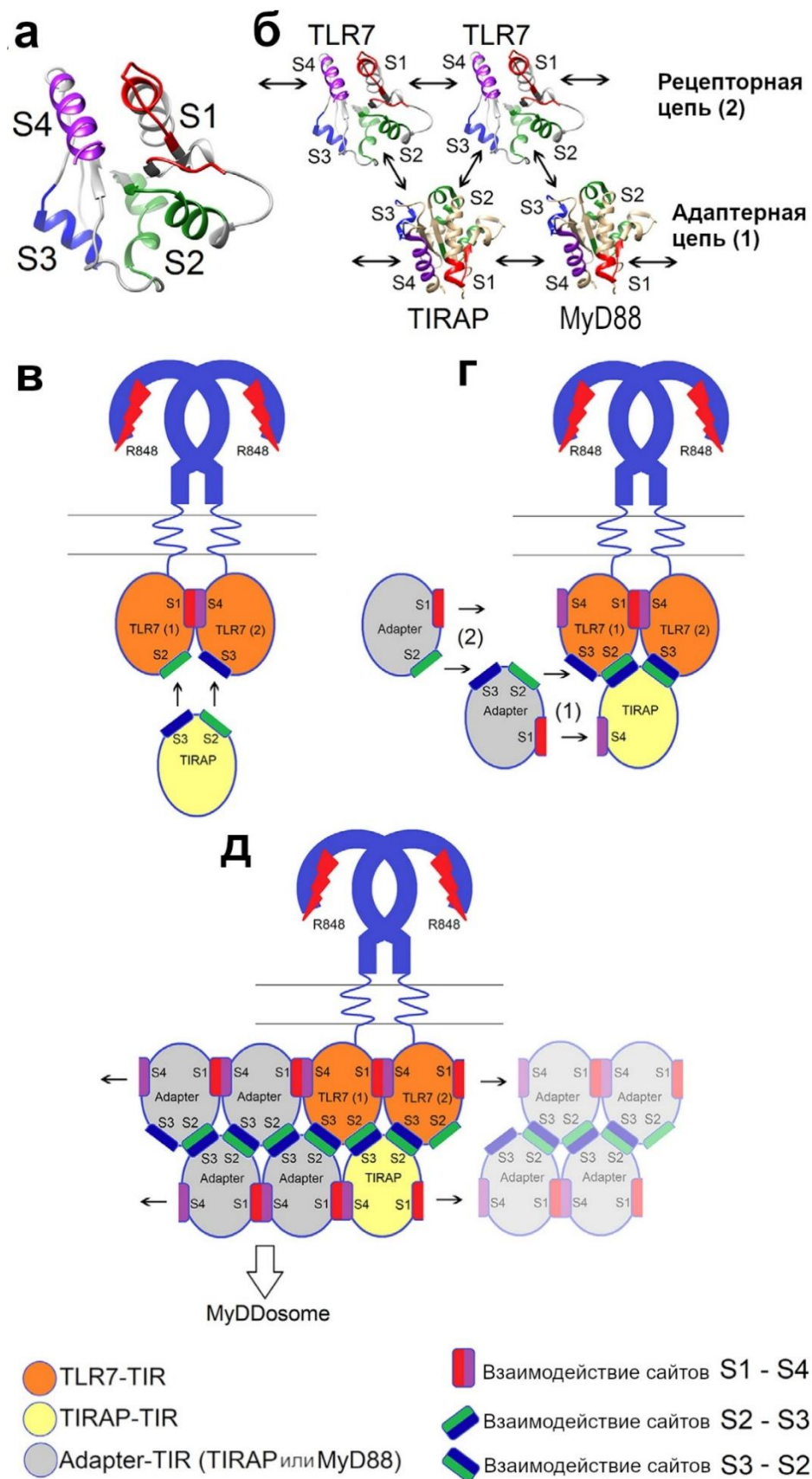


Рисунок 10 — Сайты взаимодействия TIR доменов и механизм сборки сигнального комплекса при активации TLR

а – 4 сайта (сайты **S1–S4**) осуществляют функциональные взаимодействия TIR доменов.

б – Схема взаимодействия TIR доменов при сборке сигнал-инициирующего комплекса. Сайты **S1** взаимодействуют с сайтами **S4**; сайты **S2** с сайтами **S3**.

в – Взаимодействие эктодоменов TLR с агонистом меняет конформацию рецепторного димера, позволяя физический контакт цитоплазматических TIR доменов. Взаимодействие рецепторных TIR доменов через сайты **S1–S4** создаёт композиционный сайт связывания адаптерного TIR домена по кооперативному механизму.

г – Присоединение TIR домена адаптерного белка создаёт дополнительный сайт кооперативного связывания TIR домена, что позволяет комплексу расти латерально, поочерёдно увеличивая адаптерную (1) и рецепторную (2) цепи комплекса.

д – В зависимости от активируемого TLR и экспрессии адаптерных белков, комплекс может элонгироваться как в одном, так и двух направлениях. Билатеральная элонгация усиливает передачу сигнала. Привлечение в комплекс 4-х молекул MyD88 посредством взаимодействий TIR доменов запускает сборку MyDDосомы (Рис. 1), сигнального комплекса, образованного доменами смерти MyD88 и киназ семейства IRAK, обеспечивая дальнейшую передачу сигнала.

- Рекрутирование первого TIR домена адаптера создаёт добавочные композитные сайты кооперативного связывания, к которым последовательно рекрутируются дополнительные молекулы адаптерных белков (Рис. 10г).
- Рекрутирование адаптерных TIR доменов ведет к образованию открытого двуцепочечного линейного комплекса, в котором TIR домены внутри цепей взаимодействуют через сайты **S1** и **S4**, а межцепочечные взаимодействия осуществляются за счёт реципрокных **S2–S3** взаимодействий (Рис. 10г).
- Рост сигнального комплекса может идти как однонаправленно, так и двунаправленно (Рис. 10д). Двунаправленная элонгация комплекса усиливает сигнализацию.
- Привлечение в комплекс 4-х молекул MyD88 запускает формирование Миддосомы, сигнального комплекса, образованного доменами смерти адаптера MyD88 и киназ семейства IRAK (Рис. 10д).

6.3. Классификация ингибирующих пептидов

В результате скрининга пептидных библиотек были идентифицированы ингибиторные пептиды, происходящие из всех 4-х сайтов функциональных TIR-TIR взаимодействий. Соответственно, пептиды могут быть классифицированы

согласно представляемым ими сайтам. Кроме того, на основании проявляемых функциональных свойств и механизма действия выделили следующие перекрывающиеся группы пептидов:

Группа 1. Мультиспецифические ингибиторы – способны ингибировать несколько TLR либо за счёт связывания адаптера, общего для серии TLR, либо за счёт представления высококонсервативного сайта, способного связывать различные TIR домены (например, пептиды **2R9**, **4BB**, **7R9** и **5R667**).

Группа 2. Селективные ингибиторы – пептиды, специфически блокирующие передачу сигнала с определённых TLR или через определённые адаптеры (например, пептид **9R34-ΔN** специфичный для TLR9, или пептид **TF5** – TRAM-связывающий пептид, специфичный для TRIF-зависимой ветви TLR4).

Группа 3. Адаптер-специфические ингибиторы – пептиды, связывающие специфические адаптерные белки и блокирующие их рекрутирование (пептиды **2R9**, **4R9** и **5R667**).

Группа 4. Ингибиторы, блокирующие формирование рецепторного димера – пептиды, блокирующие димеризацию TIR доменов TLR (например, пептиды **4BB**, **9R34-ΔN** и **4αE**).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение можно констатировать, что предложенный нами комплекс методических подходов, основывающийся на скрининге пептидных библиотек, представляющих вероятные сайты связывания TIR доменов, с последующей идентификацией белковых мишеней ингибиторных пептидов в тестах на клетках, верификацией ингибиторного действия пептидов в экспериментах *in vivo* и биоинформатическим анализом, позволил идентифицировать сайты TIR-TIR взаимодействий, осуществляющих инициацию передачи сигнала Толл-подобными рецепторами, и разработать коллекцию ингибиторных пептидов, способных эффективно ингибировать TLR *in vitro* и *in vivo* за счет блокировки сигнал-

зависимых взаимодействий TIR доменов. Эти данные создают основу для применения аналогичных подходов для изучения взаимодействий ДВБ других типов, таких как домены смерти, CARD или DED домены, с целью разработки иммуносупрессоров нового поколения.

ВЫВОДЫ

1. Предложен комплекс методических подходов, позволяющих идентифицировать сайты взаимодействия белков, ответственные за сборку сигнальных комплексов, и разрабатывать пептидные ингибиторы, блокирующие сборку.
2. Начальный этап сборки олигомерных сигнальных комплексов при активации TLR осуществляется за счёт четырёх сайтов связывания, присутствующих на TIR доменах TLR и их адаптерных белков. Два сайта (**S1** и **S4**) располагаются в районах краевых тяжей β -листа; два других сайта (**S2** и **S3**) формируются α -спиралями В, С и D.
3. Бинарные взаимодействия TIR доменов характеризуются значительной мультиспецифичностью, но не являются универсальными. TIR домены демонстрируют различную степень перекрёстной реактивности, что обеспечивает как специфичность, так и гибкость в формировании сигнальных комплексов.
4. Пептиды, соответствующие последовательностям, формирующим сайт связывания TIR домена или его бóльшую часть, способны блокировать передачу сигнала с соответствующих TLR *in vitro* и *in vivo*.
5. Идентифицированные БП представляют собой перспективную платформу для разработки новых противовоспалительных препаратов, способных избирательно подавлять TLR-специфические сигнальные пути без полного выключения иммунной системы.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук:

1. Hirschfeld M., Weis J.J., **Toshchakov V.**, Salkowski C.A., Cody M.J., Ward D.C., Qureshi N., Michalek S.M., Vogel S.N. Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages // *Infection and Immunity*. – 2001. – vol. 69, № 3. – pp. 1477-1482. DOI: 10.1128/IAI.69.3.1477-1482.2001. Импакт-фактор 3,4 (JIF). (1/0,1)⁴.
2. **Toshchakov V.**, Jones B.W., Perera P.Y., Thomas K., Cody M.J., Zhang S., Williams B.R.G., Major J., Hamilton T.A., Fenton M.J., Vogel S.N. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages // *Nature Immunology*. – 2002. – vol. 3, № 4. – pp. 392-398. DOI: 10.1038/ni774. Импакт-фактор 26,5 (JIF). (1,3/0,6).
3. **Toshchakov V.**, Jones B.W., Lentschat A., Silva A., Perera P.Y., Thomas K., Cody M.J., Zhang S., Williams B.R.G., Major J., Hamilton T.A., Fenton M.J., Vogel S.N. TLR2 and TLR4 agonists stimulate unique repertoires of host resistance genes in murine macrophages: interferon- β -dependent signaling in TLR4-mediated responses // *Journal of Endotoxin Research*. – 2003. – vol. 9, № 3. – pp. 169-175. DOI: 10.1179/096805103125001577. Импакт-фактор 1,9 (JIF). (0,7/0,3).
4. Rhee S.H., Jones B.W., **Toshchakov V.**, Vogel S.N., Fenton M.J. Toll-like receptors 2 and 4 activate STAT1 serine phosphorylation by distinct mechanisms in macrophages // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – vol. 278, № 25. – pp. 22506–22512. DOI: 10.1074/jbc.M208633200. Импакт-фактор 4,1 (JIF). (1,3/0,3).
5. **Toshchakov V.U.**, Basu S., Fenton M.J., Vogel S.N. Differential involvement of BB loops of Toll-IL-1 Resistance (TIR) domain-containing adapter proteins in TLR4-versus TLR2-mediated signal transduction // *The Journal of Immunology*. – 2005. –

⁴ - объем в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах

- vol. 175, № 1. – pp. 494-500. DOI: 10.4049/jimmunol.175.1.494. Импакт-фактор 4,0 (JIF). (0,9/0,5).
6. **Toshchakov V.Y.**, Vogel S.N. Cell-penetrating TIR BB loop decoy peptides: a novel class of TLR signaling inhibitors and a tool to study topology of TIR-TIR interactions // Expert Opinion on Biological Therapy. – 2007. – vol. 7, № 7. – pp. 1035-1050. DOI: 10.1517/14712598.7.7.1035. Импакт-фактор 4,0 (JIF). (2,1/1,7).
 7. **Toshchakov V.Y.**, Fenton M.J., Vogel S.N. Cutting edge: differential inhibition of TLR signaling pathways by cell-permeable peptides representing BB loops of TLRs // The Journal of Immunology. – 2007. – vol. 178, № 5. – pp. 2655-2660. DOI: 10.4049/jimmunol.178.5.2655. Импакт-фактор 4,0 (JIF). (0,9/0,7).
 8. Rallabhandi P., Nhu Q.M., **Toshchakov V.Y.**, Piao W., Medvedev A.E., Hollenberg M.D., Fasano A., Vogel S. N. Analysis of proteinase-activated receptor 2 and TLR4 signal transduction: a novel paradigm for receptor cooperativity // Journal of Biological Chemistry. – 2008. – vol. 283, № 36. – pp. 24314-24325. DOI: 10.1074/jbc.M804800200. Импакт-фактор 4,1 (JIF). (1,9/0,2).
 9. **Toshchakov V.Y.**, Szmazinski H., Couture L.A., Lakowicz J.R., Vogel S.N. Targeting TLR4 signaling by TLR4 Toll/IL-1 receptor domain-derived decoy peptides: identification of the TLR4 Toll/IL-1 receptor domain dimerization interface // The Journal of Immunology. – 2011. – vol. 186, № 8. – pp. 4819-4827. DOI: 10.4049/jimmunol.1002424. Импакт-фактор 4,0 (JIF). (1,7/1,2).
 10. Couture L.A., Piao W., Ru L.W., Vogel S.N., **Toshchakov V.Y.** Targeting Toll-like receptor (TLR) signaling by Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein/MyD88 adapter-like (TIRAP/Mal)-derived decoy peptides // Journal of Biological Chemistry. – 2012. – vol. 287, № 29. – pp. 24641-24648. DOI: 10.1074/jbc.M112.360925. Импакт-фактор 4,1 (JIF). (1,3/0,6).
 11. Piao, W., Ru, L.W., **Toshchakov, V.Y.** Recruitment of TLR adapter TRIF to TLR4 signaling complex is mediated by the second helical region of TRIF TIR domain // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 2013. – vol. 110, № 47. –

- pp. 19036-19041. DOI: 10.1073/pnas.1313575110. Импакт-фактор 9.5 (JIF). (1,5/0,7).
12. Piao W., Vogel S.N., **Toshchakov V.Y.** Inhibition of TLR4 signaling by TRAM-derived decoy peptides in vitro and in vivo // *The Journal of Immunology*. – 2013. – vol. 190, № 5. – pp. 2263-2272. DOI: 10.4049/jimmunol.1202703. Импакт-фактор 4,0 (JIF). (1,7/0,8).
 13. Szmazinski H., **Toshchakov V.**, Piao W., Lakowicz J.R. Imaging of protein secretion from a single cell using plasmonic substrates // *Bionanoscience*. – 2013. – vol. 3, № 1. – pp. 30-36. DOI: 10.1007/s12668-013-0076-7. Импакт-фактор 4,0 (JIF). (0,9/0,2).
 14. Szmazinski, H., **Toshchakov V.**, Lakowicz J.R. Application of phasor plot and autofluorescence correction for study of heterogeneous cell population // *Journal of Biomedical Optics*. – 2014. – vol. 19, № 4. – P. 046017. DOI: 10.1117/1.JBO.19.4.046017. Импакт-фактор 3,3 (JIF). (1,3/0,3).
 15. Piao W., Shirey K.A., Ru L.W., Lai W., Szmazinski H., Snyder G.A., Sundberg E.J., Lakowicz J.R., Vogel S.N., **Toshchakov V.Y.** A decoy peptide that disrupts TIRAP recruitment to TLRs is protective in a murine model of influenza // *Cell Reports*. – 2015. – vol. 11, № 12. – pp. 1941-1952. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.05.035. Импакт-фактор 7,7 (JIF). (2,5/1).
 16. Piao W., Ru L.W., **Toshchakov V.Y.** Differential adapter recruitment by TLR2 co-receptors // *Pathogens and Disease*. – 2016. – vol. 74, № 5. – P. ftw043. DOI: 10.1093/femspd/ftw043. Импакт-фактор 2,7 (JIF). (1,1/0,5).
 17. Javmen A., Szmazinski H., Lakowicz J.R., **Toshchakov V.Y.** Blocking TIR domain interactions in TLR9 signaling // *The Journal of Immunology*. – 2018. – vol. 201, № 3. – pp. 995-1006. DOI: 10.4049/jimmunol.1800194. Импакт-фактор 4,0 (JIF). (2,2/0,9).
 18. Javmen A., Szmazinski H., Lakowicz J.R., **Toshchakov V.Y.** Frontline science: Targeting the TLR7 signalosome assembly // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2020.

- vol. 108, № 6. – pp. 1697-1706. DOI: 10.1002/JLB.2HI0819-180R. Импакт-фактор 3,4 (JIF). (1,4/0,6).
19. **Toshchakov V.Y.**, Neuwald A.F. A survey of TIR domain sequence and structure divergence // Immunogenetics. – 2020. – vol. 72, № 3. – pp. 181-203. EDN: XQHUGD. Импакт-фактор 2,1 (JIF). (2,8/2,0).
 20. **Toshchakov V.Y.**, Javmen A. Targeting the TLR signalosome with TIR domain-derived cell-permeable decoy peptides: the current state and perspectives // Innate Immunity. – 2020. – vol. 26, № 1. – pp. 35-47. EDN: LIPYBH. Импакт-фактор 3,5 (JIF). (1,6/1,1).
 21. Richard K., Piepenbrink K.H., Shirey K.A., Gopalakrishnan A., Nallar S.C., Prantner D.J., Perkins D.J., Lai W., Vlk A., **Toshchakov V.Y.**, Feng C., Fanaroff R., Medvedev A.E., Blanco J.C.G., Vogel S.N. A mouse model of human TLR4 D299G/T399I SNPs reveals mechanisms of altered LPS and pathogen responses // The Journal of Experimental Medicine. – 2021. – vol. 218, № 2. – e20200675. EDN: FCGZXW. Импакт-фактор 11,6 (JIF). (3,0/0,1).
 22. Javmen A., Zou J., Nallar S.C., Szmanski H., Lakowicz J.R., Gewirtz A.T., **Toshchakov V.Y.** TLR5-derived, TIR-interacting decoy peptides to inhibit TLR signaling // The Journal of Immunology. – 2023. – vol. 210, № 9. – pp. 1419-1427. EDN: BZIFKE. Импакт-фактор 4,0 (JIF). (1,4/0,6).
 23. **Тоцаков В.Ю.** Пептидные блокаторы индуцированных взаимодействий сигнальных белков: текущее состояние и перспективы развития (обзор) // Биохимия. – 2024. – Т. 89, № 5. – С. 755-771. EDN: YPFIEI. Импакт-фактор 1,9 (РИНЦ). (1,9/1,9).
Перевод: **Toshchakov V.Y.** Peptide-based inhibitors of the induced signaling protein interactions: current state and prospects // Biochemistry (Moscow). – 2024. – vol. 89, № 5. – pp. 784-798. EDN: XZKVHB. Импакт-фактор 2,1 (JIF). (1,9/1,9).
 24. Atamas S.P., Lockatell V., Todd N.W., Papadimitriou J.C., Rus V., Lugkey K.N., Vogel S.N., **Toshchakov V.Y.**, Luzina I.G. Therapeutic targeting of full-length

interleukin-33 protein levels with cell-permeable decoy peptides attenuates fibrosis in the bleomycin model in vivo // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2025. – vol. 392, № 1. – P. 100008. DOI: 10.1124/jpet.123.002050. Импакт-фактор 4,3 (JIF). (1,8/0,3).

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФ – анизотропия флуоресценции

БП – блокирующий пептид

ДВБ – домен взаимодействия белков

ДС – домен (клеточной) смерти

МАП – митоген-активируемая протеин (киназа)

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

araLAM – arabinose-capped lipoarabinomannan

ВМЕ – β -меркаптоэтанол

BPPS – Bayesian Partition with Pattern Selection

BSA – бычий сывороточный альбумин

BTX – Bodipy TMR-X (6-((4,4-difluoro-1,3-dimethyl-5-(4-methoxyphenyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-2-propionyl)amino) hexanoic acid)

Cer – Cerulean (Лазурный) – вариант голубого флуоресцентного белка медуз *Aequorea victoria*, характеризующийся повышенной фотостабильностью и однокомпонентным характером затухания флуоресценции в водных растворах

СуЗ – цианин-3

D-гал – D-галактозамин

FLIM – микроскопия времени жизни флуоресценции

FRET – Фёрстеровский резонансный перенос энергии

IL – интерлейкин

IL-1R – Interleukin-1 receptor

IRAK – Interleukin-1 receptor associated kinase

LPS – липополисахарид

MyD88 – myeloid differentiation primary response gene 88

NF- κ B – nuclear factor kappa B

ODN1668 – иммуностимуляторный олигонуклеотид ODN1668

OspC – *Borrelia burgdorferi* lipoprotein OspC

Pam3Cys (P3C)– трипальмитоилированный липопептид S-[2,3-бис(пальмитоил-окси)-(2-RS)-пропил]-N-пальмитоил-(R)-Cys-(S)-Ser-Lys₄-OH

Pam2Cys (P2C)– дипальмитоилированный липопептид S-[2,3-бис(пальмитоил-окси)-(2-RS)-пропил]-Cys-(S)-Ser-Lys₄-OH

PR8 – адаптированный к мышам штамм вируса гриппа H1N1 A/PR/8/34

STAT-1 – signal transducer and activator of transcription 1

TIR – домен взаимодействия белков, присутствующий в Toll белках насекомых, в Toll-подобных рецепторах, в рецепторах цитокинов семейства интерлейкина 1, а также в белках сопротивляемости растений

TIRAP – Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein

TLR – Toll-like receptor (Толл-подобный рецептор)

TNF – фактор некроза опухоли

TRAM – TRIF-related adapter molecule

TRIF – TIR domain-containing adapter protein-inducing interferon