

НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ «СИРИУС»

На правах рукописи

Тощаков Владимир Юрьевич

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

Специальность 3.2.7. Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Сириус – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	ВВЕДЕНИЕ	8
2.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	27
2.1	Функциональность и распространение TIR доменов в биосфере	27
2.2	Структура TIR доменов	29
2.3	TIR домен-содержащие белки, вовлечённые в индукцию и регуляцию иммунного ответа человека	31
2.4	Функционально-значимые мутации TIR доменов млекопитающих	33
2.5	Концепция блокирующих пептидов как инструмента выявления структуры сигнальных комплексов	41
3.	МАТЕРИАЛЫ и МЕТОДЫ	51
3.1	Культивирование клеток	51
3.1.1	Получение и поддержание первичной культуры перитонеальных макрофагов	51
3.1.2	Получение и культивирование макрофагов костного мозга ,	52
3.1.3	Культивирование клеточных линий	52
3.2	Аналитические методы оценки функционирования сигнальных путей	53
3.2.1	Методы оценки функции Толл-подобных рецепторов в культуре клеток	53
3.2.1.1	Вестерн-блоттинг	53
3.2.1.2	Оценка экспрессии цитокиновой мРНК	54
3.2.1.2.1	Выделение РНК методом фенол-хлороформной экстракции	54
3.2.1.2.2	Синтез первичной цепи кДНК	55
3.2.1.2.3	Определение количества кДНК методом блоттинга по Саузерну	55

3.2.1.2.4	Определение количества кДНК методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени	56
3.2.1.3	Анализ секреции цитокинов методами иммуноферментного анализа	57
3.2.2	Оценка влияния пептидов на жизнеспособность клеток ..	57
3.2.3	Источники антител, использовавшихся в экспериментальной работе	58
3.3	Методы идентификации белков-мишеней, связываемых ингибиторными пептидами	59
3.3.1	Дот-блоттинг	59
3.3.2	Оценка пептид-белкового связывания методами спектроскопии флуоресценции <i>in situ</i>	60
3.3.2.1	FRET-система для оценки TIR-пептидного связывания в клетках	60
3.3.2.2	Детекция TIR-пептидного связывания в клетках посредством спектроскопии флуоресценции с временным разрешением	60
3.3.3	Характеристика TIR-пептидного связывания с использованием рекомбинантных TIR доменов методами анизотропии флуоресценции и поверхностного плазмонного резонанса	59
3.4	Оценка системного влияния блокирующих пептидов на TLR в моделях <i>in vivo</i>	65
3.5	Оценка способности блокирующих пептидов модулировать ответ на вирусный патоген	66
3.6	Биоинформатический анализ эволюционной изменчивости аминокислотных последовательностей TIR доменов	67
3.6.1	Идентификация TIR доменов в базах данных белковых последовательностей и построение выравнивания последовательностей известных TIR доменов	67

3.6.2	Байесова классификация TIR доменов с выявлением мотивов последовательностей, характеризующих идентифицированные классы	68
4.	РЕЗУЛЬТАТЫ и ОБСУЖДЕНИЕ	69
4.1	Демонстрация специфичности взаимодействий TIR доменов	69
4.1.1	Различия в спектрах цитокинов, индуцируемых агонистами TLR2 и TLR4	69
4.1.2	Стимуляция TLR4, в отличие от стимуляции TLR2, вызывает активацию фактора транскрипции STAT-1	72
4.1.3	Ранняя индукция IFN- β при активации TLR4 ответственна за активацию STAT-1 и различия в спектрах цитокинов, индуцируемых агонистами TLR2 и TLR4	77
4.1.4	TLR4-зависимое фосфорилирование STAT-1 по сайту Tyr701 и экспрессия интерферона β не зависят от присутствия адаптерного белка MyD88	82
4.2	Демонстрация мультивалентности взаимодействий TIR доменов	84
4.2.1	Скрининг первой библиотеки блокирующих пептидов TIR домена (библиотека TIR домена TLR4)	85
4.2.2	Скрининг библиотек блокирующих пептидов TIR доменов различных TLR	85
4.2.2.1	Скрининг пептидной библиотеки TIR домена TLR2	90
4.2.2.2	Скрининг пептидных библиотек TIR доменов TLR1 и TLR6	96
4.2.2.3	Скрининг пептидной библиотеки TIR домена TLR9	100
4.2.2.4	Скрининг пептидных библиотек TIR доменов TLR7	105

4.2.2.5	Скрининг пептидной библиотеки, представляющей TIR домен TLR5	109
4.2.3	Скрининг пептидных библиотек TIR доменов адаптерных белков	117
4.2.3.1	Скрининг пептидной библиотеки TIR домена адаптерного белка TIRAP	117
4.2.3.2	Скрининг пептидной библиотеки TIR домена адаптера TRAM	125
4.2.3.3	Скрининг пептидной библиотеки TIR домена адаптера TRIF и характеристика свойств идентифицированных ингибиторов	133
4.2.3.4	Механизм ингибиторного действия TRIF-пептидов TF4 и TF5	139
4.3	Механизм действия блокирующих пептидов: специфичность и аффинность взаимодействия блокирующих пептидов с TIR доменами в культивируемых клетках и <i>in vitro</i>	145
4.3.1	Связывание TLR4 и TLR2 флуоресцентно мечеными БП <i>in situ</i> в клеточной модели	149
4.3.2	Демонстрация специфичности TIR-пептидного связывания методами микроскопии времени жизни флуоресценции (FLIM)	151
4.3.3	Связывание TIR доменов ингибирующим пептидом библиотеки TIR домена TLR2	156
4.3.3.1	Анализ связывания ингибиторного пептида 2R9 с различными TIR доменами методами FLIM	156
4.3.3.2	Характеристика бинарного связывания TIR домена адаптерного белка TIRAP с пептидом 2R9	161
4.3.4	Специфичность связывания TIR доменов блокирующими пептидами библиотеки TIR домена TLR9	164

4.3.5	Специфичность связывания TIR доменов блокирующими пептидами библиотеки TIR домена TLR7	167
4.3.6	Специфичность связывания TIR доменов блокирующими пептидами библиотеки TIR домена TLR5	170
4.3.7	Модель взаимодействия TIR доменов при образовании цитоплазматического сигнального комплекса активированными TLR. Классификация ингибирующих пептидов на основании блокируемых сайтов функциональных TIR-TIR взаимодействий	176
4.4	Оценка эффективности системного ингибирования функции TLR блокирующими пептидами в экспериментах на мышах	181
4.4.1	Оценка влияния БП пептидных библиотек TIR доменов адаптерных белков на системную индукцию цитокинов, вызванную введением нелетальной дозы LPS	182
4.4.2	Оценка системной эффективности БП пептидных библиотек TIR доменов TLR	188
4.4.2.1	Пептид 2R9 — мультиспецифический ингибитор TLR <i>in vivo</i>	188
4.4.2.2	Пептид 9R34-ΔN — специфический ингибитор TLR9 <i>in vivo</i>	191
4.4.2.3	Пептид 7R11 ингибирует TLR7 <i>in vivo</i>	193
4.4.2.4	Пептид 5R667 ингибирует LPS-индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов <i>in vivo</i>	194
4.4.3	Оценка способности БП предотвращать TLR-индуцированную смертность	197
4.4.4	Оценка способности БП модулировать воспалительную реакцию на патогены	200
4.5	Идентификация функциональных сайтов связывания TIR доменов посредством анализа эволюционной сохранности их аминокислотных последовательностей	204

4.5.1 Мотивы аминокислотных последовательностей общие для TIR доменов	208
4.5.2 Мотивы аминокислотной последовательности, характерные для TIR доменов TLR1–6 и TLR10	211
4.5.3 Мотивы аминокислотной последовательности, характерные для TIR доменов TLR7–9	216
4.5.4 Эволюционно сохранные аминокислотные остатки и структурные особенности, характерные для TIR доменов адаптера MyD88	217
4.5.5 Эволюционно сохранные аминокислотные остатки и структурные особенности, характерные для TIR доменов адаптера TIRAP	222
4.6 Комплексный анализ результатов скрининга пептидных библиотек, представляющих сайты сигнал-зависимых взаимодействий TIR доменов	224
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ (Методология блокирующих передачу сигнала пептидов как элемент комплексного анализа механизмов передачи сигнала в сигнальных путях)	230
6. ВЫВОДЫ	234
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	246
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	251

1. ВВЕДЕНИЕ

Белковые взаимодействия лежат в основе всех биологических процессов. Белок-белковые взаимодействия с высокой аффинностью ведут к образованию стабильных четвертичных структур, то есть белковых комплексов способных выполнять ту или иную каталитическую или структурную функцию непрерывно в течение всего времени жизни комплекса. Взаимодействия белков с пониженной аффинностью лежат в основе образования транзиторных структур, способных выполнять регуляторные функции, а также, в случаях циклического формирования и диссоциации комплексов, биологических моторов. Взаимодействия белков, участвующих в передаче биологической информации, отличаются от остальных белковых взаимодействий 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. Образование таких сигнальных комплексов в подавляющем большинстве случаев осуществляется специализированными белковыми доменами, зачастую называемыми доменами взаимодействия белков (ДВБ) (Mayer, 2015; Pawson & Nash, 2003). Некоторые ДВБ, такие как SH2, SH3, или бромодомены, распознают специфические характеристические особенности или короткие мотивы, присутствующие в первичной структуре белков; тогда как домены другого типа, примерами которых являются TIR домены или домены смерти (ДС), не имеют специфического мотива связывания. ДВБ последнего типа характеризуются способностью одновременно устанавливать множественные кооперативные взаимодействия с доменами своего типа как гомо-, так и гетеротипически (Рис. 1).

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 белках насекомых, в Toll-подобных рецепторах (TLR (Toll-like receptors)) высших животных, а также в адаптерных белках, функционирующих в связке с этими рецепторами, ответственны за начальные рецептор-адаптерные взаимодействия при активации этих рецепторов (Lemaitre et al., 1996; Medzhitov et al., 1997; Poltorak et al., 1998; Rock et al., 1998). Аналогичным образом TIR домены функционируют в качестве сигнальной единицы цитокиновых рецепторов семейства рецептора интерлейкина 1 (IL-1R) (Dinarello, 2011).

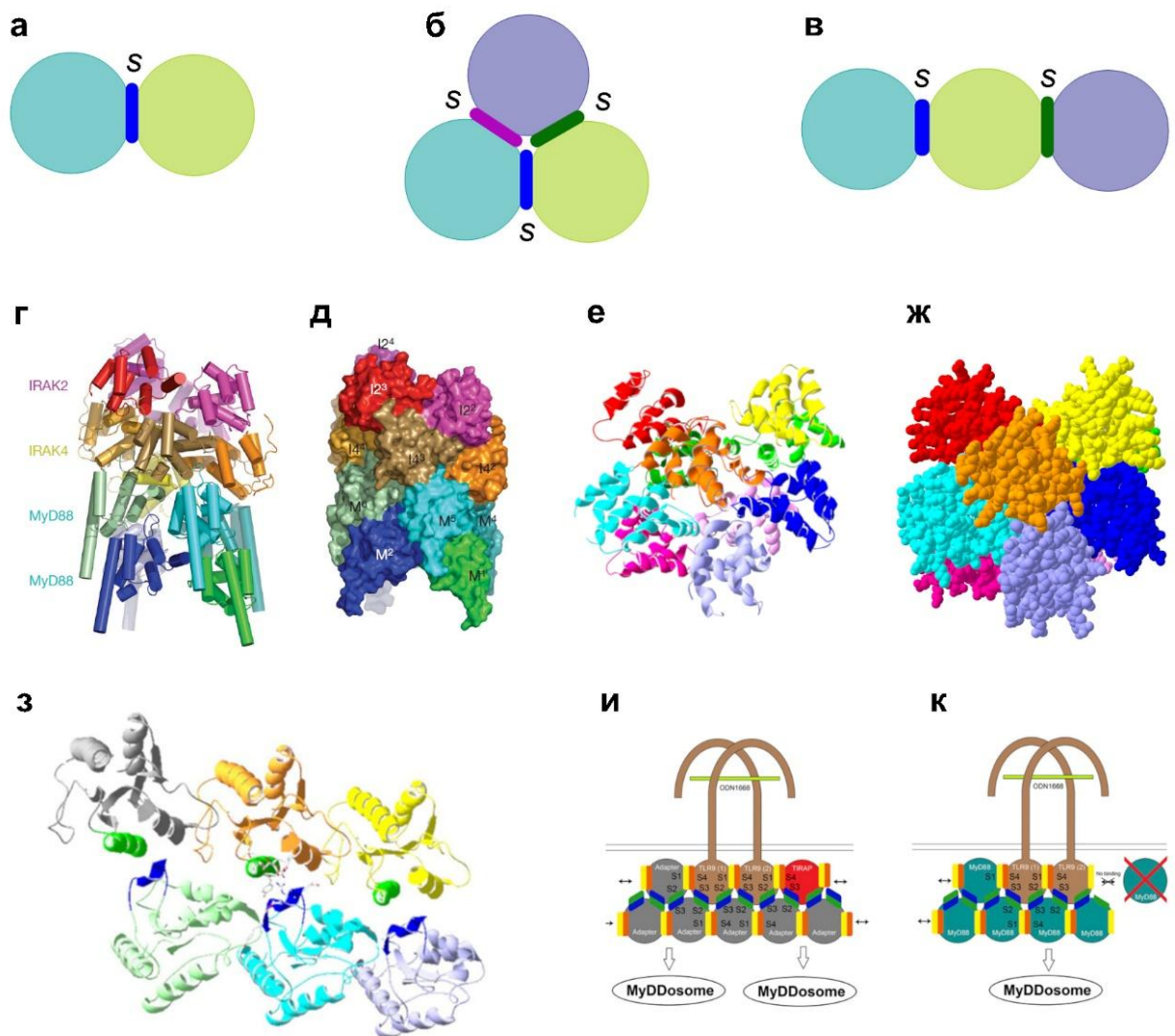


Рисунок 1 — Схемы, иллюстрирующие кооперативность взаимодействий, осуществляемых ДВБ (а-в) (Toshchakov et al., 2011), и

примеры сигнальных комплексов, образуемых ДВБ (з-к) (Javmen et al., 2018; Lin et al., 2010; Wang et al., 2010)

а – схематическое изображение димерного комплекса, сформированного двумя ДВБ. *s* – площадь контакта. Площадь контакта в бинарном взаимодействии ДВБ в типичном случае не превышает $1000 \text{ \AA}^2$, что существенно меньше площади бинарных контактов в стабильных белковых комплексах (Chen et al., 2013; Conte et al., 1999; Toshchakov & Vogel, 2007; Vishwanath et al., 2017).

б – кооперативность взаимодействия доменов возникает в случаях, когда димеризация ДВБ ведёт к образованию двухкомпонентного сайта связывания, составленного из сайтов связывания на обоих мономерах димера. Площадь контакта в таком взаимодействии глобулярных белков приблизительно равного размера утраивается, что ведет к образованию стабильного комплекса (Toshchakov et al., 2011).

в – пример некооперативного взаимодействия. При таком взаимодействии площадь контакта в тримере только удваивается. Образованный тримерный комплекс не стабильнее составляющих его димеров.

г-д – Миддосома представляет собой одноцепочечный спиральный сигнальный комплекс, образуемый доменами смерти (ДС) MyD88, IRAK4 и IRAK2 (Lin et al., 2010). 6 доменов MyD88 образуют первые полтора витка спирали (нижние на рисунке). 4 домена IRAK4 связываются поверх витка, образованного ДС MyD88. 4 домена IRAK2 связываются поверх IRAK4 и образуют верхний виток спирали. Миддосома образуется при активации TLR, а также рецепторов класса рецептора IL-1. Образование Миддосомы ведёт к фосфорилированию IRAK и активации NF-κB. Некраевые домены комплекса участвуют в шести бинарных взаимодействиях.

е-ж – сигнальный комплекс DISC, образованный доменами смерти Fas и FADD (Wang et al., 2010). 5 доменов Fas образуют нижний виток спирали. Каждый некраевой домен FADD связан с двумя ДС Fas нижнего витка, а также с двумя доменами FADD посредством латеральных взаимодействий. DISC образуется при активации рецептора Fas и вызывает апоптоз посредством активации каспаз.

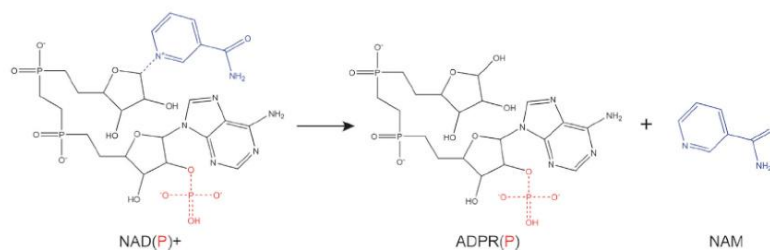
з – двуцепочечный, линейный олигомерный комплекс, образованный TIR доменами адаптерного белка TIRAP. Внутрицепочечные взаимодействия TIR доменов осуществляются регионами вблизи краевых тяжей β-листа, тяжей В и Е. Межцепочечные — посредством α-спиралей В, С и D. Некраевые TIR домены комплекса взаимодействуют с 4-мя ДВБ (Javmen et al., 2018; Ve et al., 2017).

и-к – предложенные автором варианты образования сигнального комплекса активированным рецептором TLR9 (Javmen et al., 2018). В присутствии MyD88 и TIRAP комплекс может элонгироваться в двух направлениях (**и**). Однонаправленная элонгация комплекса в отсутствие TIRAP ведёт к ослабленной передаче сигнала (**к**) (Javmen et al., 2018).

Функции TIR доменов не исчерпываются ролью в формировании транзиторных сигнальных комплексов. Так, TIR домены активированного белка SARM1 многоклеточных животных способны катаболизировать никотинамиддинуклеотид (НАД) на аденозиндифосфорибозу и никотинамид, посредством чего вызывается Валерианова деградация аксонов при механической или химической травме (Essuman et al., 2017) (Рис. 2). Интересно, что аналогичная каталитическая функция также присуща некоторым бактериальным и растительным TIR доменам (Essuman et al., 2018; Horsefield et al., 2019; Lapin et al., 2022). Так НАДазная активность, присущая R белкам растений (Wan et al., 2019), а также бактериальным TIR-содержащим белкам, принадлежащим к антифагальным системам Argonaute и Thoeris, обеспечивает антимикробную защиту посредством абортивной инфекции, вызывая программируемую гибель инфицированных клеток (Koorpal et al., 2022; Lopatina et al., 2020; Ofir et al., 2021) (Рис. 2). Суммируя известные к настоящему времени данные о функциональности TIR доменов, можно резюмировать, что TIR домены как про-, так и эукариот в значительной степени эволюционировали как компонент антимикробной защиты. В то время как бактериальные и растительные TIR домены могут использовать каталитическую функцию для реализации антимикробной защиты посредством механизма абортивной инфекции, вызывая гибель инфицированных клеток, преобладающее большинство TIR доменов животных, не обладая собственной каталитической активностью, индуцируют более сложные защитные механизмы, функционируя как ДВБ.

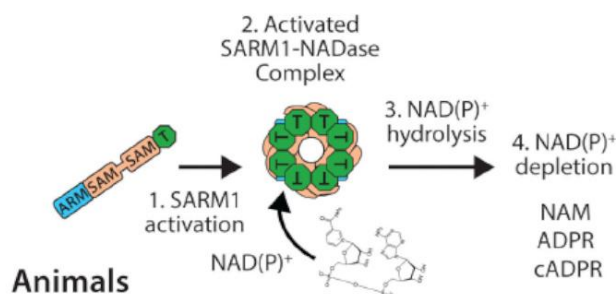
Представленные к защите исследования автора концентрировались на выяснении механизмов функционирования TIR доменов в качестве ДВБ Толл-подобных рецепторов (TLR), а также адаптерных белков, непосредственно взаимодействующих с TLR. Наши исследования, однако, также включали и биоинформатический анализ последовательностей TIR доменов прокариот и растений (Toshchakov & Neuwald, 2020), что было выполнено с целью лучшего понимания характеристик, определяющих специфику функциональности основного объекта исследования.

а



б

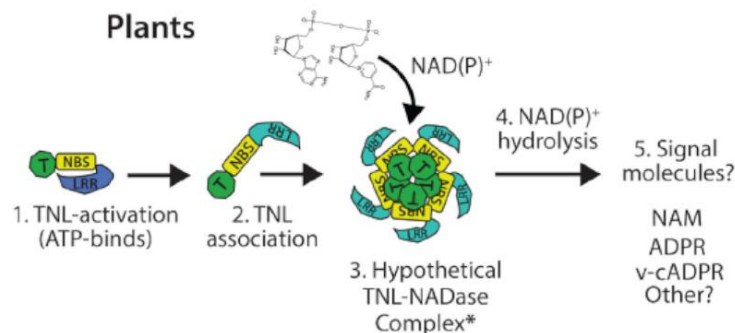
TIR-NADases (animals/plants/bacteria)



Animals

в

Plants



Bacteria

TIR-containing components of bacterial Thoeris and Argonaute antiviral defence systems

Рисунок 2 — Функциональность каталитической активности, присущей некоторым TIR доменам.

а – TIR домены некоторых белков способны расщеплять никотинамиддинуклеотиды на аденозиндифосфорибозу и никотинамид.

б – белок SARM1 олигомеризуется при активации, вследствие чего он обретает НАДазную активность. НАДазная активность TIR доменов SARM1 осуществляет Валерианову деградацию аксонов при механическом или химическом повреждении (Essuman et al., 2017).

в – R белки растений активируются при бактериальных и вирусных инфекциях и вызывают локальную клеточную смерть как посредством расщепления пула НАД, так и за счёт активации эффекторных белков вторичными мессенджерами нуклеотидной природы, образуемыми при распаде НАД (Wan et al., 2019).

г – TIR-содержащие белки бактериальных антифагальных систем Argonaute и Thoeris осуществляют антивирусную защиту посредством элиминации инфицированных клеток за счёт деградации пула НАД (Koopal et al., 2022; Ofir et al., 2021).

Актуальность темы исследования. Несмотря на то, что базовые принципы белок-белкового распознавания были сформулированы ещё в середине 70-х годов прошлого века (Chothia & Janin, 1975), 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 как вследствие множественности сайтов связывания, типично присутствующих на ДВБ, так и вследствие относительной слабости и мультиспецифичности каждого из бинарных взаимодействий (Toshchakov & Vogel, 2007). Взаимодействия ДВБ, присутствующих на TLR и адаптерных белках, непосредственно взаимодействующих с TLR, необходимы для инициации внутриклеточного сигнала и активации защитных воспалительных механизмов при инфекционных и иных воспалительных заболеваниях (Kawai & Akira, 2011). 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 BB (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 существенно продвинули понимание механизмов инициации внутриклеточной передачи сигнала при активации TLR. Так, мы были первой группой, описавшей существенные различия в спектрах цитокинов, индуцированных агонистами TLR4 и TLR2 в макрофагах, и выяснившей механизм возникновения этих различий (Hirschfeld et al., 2001; Toshchakov et al., 2002). Это открытие продемонстрировало специфичность взаимодействий TIR доменов при активации TLR, поскольку показало, что адаптерные белки специфически рекрутируются TIR доменами TLR4 и TLR2 при активации. Наши дальнейшие исследования существенно продвинули понимание механизмов распознавания TIR доменов и охарактеризовали многие сайты связывания, присутствующие на отдельных доменах (Couture et al., 2012; Javmen et al., 2018, 2020, 2023;

Piao, Ru, et al., 2013a; Piao, Vogel, et al., 2013b; Piao et al., 2015, 2016; Toshchakov et al., 2011). С другой стороны, существенный вклад в понимание распознавания TIR доменов был сделан независимыми структурно-биологическими исследованиями, которые охарактеризовали комплексы, спонтанно формируемые рекомбинантными TIR доменами белков TIRAP и MyD88 (Clabbers et al., 2021; Ve et al., 2017). Несмотря на достигнутый в последнее десятилетие существенный прогресс в понимании механизмов функционирования ДВБ, существуют различия в интерпретации результатов, полученных различными методами и группами (например (Javmen et al., 2018; Ve et al., 2017)), показывая, что точная формулировка принципов специфического распознавания TIR доменов, а также полная каталогизация сайтов TIR-TIR связывания, требуют дальнейших исследований.

Цели и задачи 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 таковых взаимодействий.

Достижение поставленных целей требовало решения следующих задач: идентификация пептидов, способных блокировать внутриклеточные взаимодействия TIR доменов; анализ эволюционной вариабельности TIR доменов с целью выявления функциональных сайтов связывания; идентификация TIR доменов, преимущественно связываемых блокирующими пептидами в клетках; а также детальная оценка эффективности пептидных ингибиторов TLR *in vitro* и *in vivo* при помощи стандартных методов молекулярной биологии.

Научная новизна. Включённое в материалы диссертации открытие того, что активация TLR4, в отличие от активации TLR2, индуцирует раннюю продукцию IFN- β , посредством чего существенно изменяется спектр цитокинов, продуцируемых макрофагами (Hirschfeld et al., 2001; Toshchakov

et al., 2002, 2003), изменило господствующую на то время парадигму о том, что различные TLR, активируясь различными классами микробных молекул, продуцируют в целом сходный ответ, заключающийся в активации транскрипционных факторов семейства NF- κ B, а также МАП киназ. Наше открытие привело к пониманию специфичности взаимодействий, осуществляемых TIR доменами, идентификации адаптерных белков MyD88-независимого сигнального пути, и последующей характеристике многих сайтов связывания, присутствующих на TIR доменах.

Теоретическая и практическая значимость работы. Выяснение принципов распознавания белков, лежащих в основе формирования сигнальных комплексов, чрезвычайно актуально как с теоретической, так и с практической точки зрения. Понимание этих принципов сделает 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 (Attwood et al., 2020), 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.

Методология и методы исследования. Представленные к защите исследования выполнены с применением широкого спектра методов, которые включает в себя как стандартные методы молекулярной и клеточной биологии, так и оригинальные методы, специально разработанные для достижения специфических целей исследования, а также компьютерный анализ эволюционной изменчивости TIR доменов. Так, мы разработали концепцию и впервые применили скрининг библиотек пептидов, блокирующих сигнал-зависимые взаимодействия ДВБ, для идентификации сайтов связывания ДВБ и разработки ингибиторов передачи сигнала, осуществляемого при участии данного ДВБ (Toshchakov

et al., 2011). Также была разработана оригинальная система для количественной оценки связывания блокирующих пептидов с TIR доменами непосредственно в клетке (Toshchakov et al., 2011). Эта система предусматривает транзиторную эктопическую экспрессию панели TIR доменов, каждый из которых связан с белковой флуоресцентной меткой, с последующей обработкой экспрессирующих клеток блокирующими пептидами, меченых флуорофором, способным поглощать флуоресценцию белковой метки TIR домена. Связывание пептида с TIR доменом оценивается по тушению флуоресценции белкового флуорофора флуоресцентной меткой пептида за счёт Фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET), причём тушение флуоресценции оценивалось по скорости затухания флуоресценции донора в присутствии акцептора (Toshchakov et al., 2011). В наших исследованиях в качестве донора флуоресценции использовалась белковая метка Cerulean (Cer) (Rizzo et al., 2004) совместно с Bodipy-TMR-X или Cy3 в качестве прикреплённого к пептиду акцептора. В наших поздних исследованиях тушение флуоресценции оценивалось посредством микроскопии времени жизни флуоресценции (FLIM), используя как импульсное возбуждение флуоресценции (time domain FLIM) (Javmen et al., 2018, 2020, 2023), так и возбуждение, модулируемое по интенсивности с варьируемой частотой (frequency domain FLIM) (Javmen et al., 2018; Piao et al., 2015; Szmanski et al., 2013, 2014).

Выявление эволюционно сохранных мотивов TIR доменов, ответственных за их функциональную специализацию, проводилось посредством крупномасштабного статистического анализа белковых последовательностей, с помощью которого была построена иерархическая классификация белковых доменов на основе программно обнаруживаемых мотивов, специфичных для каждой из групп и подгрупп классификации (Toshchakov & Neuwald, 2020). Проведённый анализ классифицировал ортологичные TIR домены высших животных в отдельные группы и, таким

образом, позволил выявить многие мотивы, характерные для функционально специализированных групп TIR доменов, включая мотивы ответственные за специфичность TIR-TIR взаимодействий (Toshchakov & Neuwald, 2020). Многие из компьютерно обнаруженных мотивов подтверждены экспериментально как ретроспективно (Toshchakov & Neuwald, 2020), так и вновь выполненными исследованиями (Javmen et al., 2023).

Оценка ингибиторной активности блокирующих пептидов проводилась стандартными методами молекулярной и клеточной биологии, с помощью которых оценивалась экспрессия цитокиновой мРНК, содержание цитокинов в клеточных супернатантах и пробах крови. Протеомные эффекты ингибиторов оценивались как по появлению модификаций белков, фосфорилированных по сайтам, специфичным для активированных белков, так и по общему уровню экспрессии отдельных белков. Для этого клеточные лизаты подвергались электрофорезу на полиакриламидном геле с последующим анализом посредством различных модификаций вестерн-блоттинга (Mahmood & Yang, 2012; Toshchakov et al., 2005).

Блокирующие пептиды, демонстрирующие высокую активность в экспериментах, выполненных на культивируемых клетках, тестировались в экспериментах на мышах в трёх типах экспериментов. Во-первых, пептиды оценивались по способности подавлять системную активацию цитокинов, индуцированную введением нелетальной дозы очищенных агонистов TLR (Couture et al., 2012; Javmen et al., 2018, 2020, 2023; Piao, Ru, et al., 2013a; Piao, Vogel, et al., 2013b; Piao et al., 2015). Пептиды с подтверждённой способностью блокировать индукцию цитокинов *in vivo* тестировались на способность подавлять гибель животных, вызванную введением высоких доз LPS (Piao, Ru, et al., 2013a; Piao, Vogel, et al., 2013b) или введением нелетальных агонистов TLR в сочетании с D-галактозамином (Javmen et al., 2018). Мультиспецифичный пептид, который демонстрировал высокую ингибиторную активность в отношении нескольких TLR, был протестирован

на способность снижать смертность при инфицировании мышей вирусом гриппа (Piao et al., 2015).

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 B) и α -спиралью D.
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.

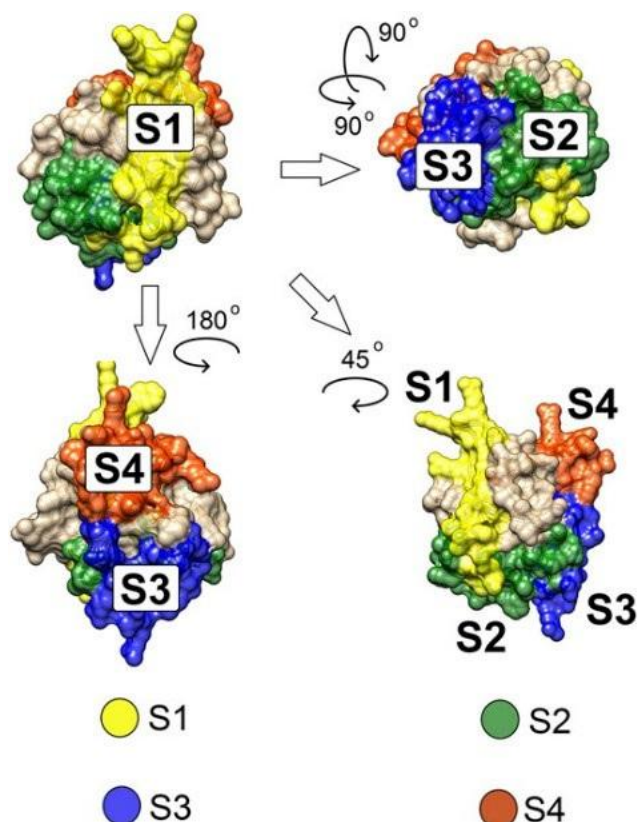


Рисунок 3 — Расположение сайтов взаимодействия TIR доменов, осуществляющих сборку цитоплазматических сигнальных комплексов при активации TLR (Javmen et al., 2018)

4 сайта связывания TIR доменов, обозначенные на Рисунке как S1 – S4, ответственны за сборку сигнальных комплексов, инициирующих передачу сигнала с активированных TLR. Сайты S1 и S4 расположены на противоположных концах TIR домена, в районах краевых тяжей β -листа. Сайты S2 и S3 располагаются в одной полусфере. Сайт S2 формируется спиралями В и/или С; сайт 3 — спиралью D вместе с прилегающими петлями (Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020).

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты вынесенных на защиту исследований представлены в 24 публикациях в рецензируемых научных журналах. Эти публикации включают статьи в высокорейтинговых международных журналах *Nature Immunology*, *PNAS*, *Journal of Immunology*, *Cell Reports* и *Journal of Biological Chemistry*. Каждая из опубликованных статей прошла независимую научную экспертизу перед

опубликованием. Статьи, непосредственно связанные с темой диссертации, были процитированы в специальной литературе более 4000 раз, что, по нашему мнению, также подтверждает достоверность и значимость полученных результатов. По материалам диссертационной работы было подготовлено 17 презентаций на международных научных конференциях, представленных как в форме стендовых докладов, так и в устных выступлениях на заседаниях специализированных секций. Неполный список конференций, на которых докладывались и обсуждались результаты данного диссертационного исследования включает: конференцию “Experimental Biology 2005”, проведённую 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, проведённые 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; 1-ый Международный Санкт-Петербургский конгресс по аутоиммунностям, Санкт-Петербург, Россия, 2017; а также 5-ый Европейский конгресс иммунологии (ECI 2018), Амстердам, Нидерланды, 2018 год.

Наиболее эффективные блокирующие пептиды, идентифицированные в наших исследованиях в экспериментах на культуре клеток, были протестированы, и их эффективность подтверждена в экспериментах на лабораторных животных (Couture et al., 2012; Javmen et al., 2018, 2020, 2023; Piao, Ru, et al., 2013a; Piao, Vogel, et al., 2013b; Piao et al., 2015). Многие из

идентифицированных ингибирующих пептидов были ресинтезированы и повторно использованы в контрольных экспериментах в наших последующих исследованиях (Javmen et al., 2018, 2020, 2023; Piao, Vogel, et al., 2013b; Piao et al., 2015, 2016; Szmanski et al., 2014), а также подтверждены в независимых исследованиях других групп (Лысакова et al., 2025; Lysakova et al., 2026; Rallabhandi et al., 2008; Richard et al., 2021; Weber et al., 2014). Концепция и экспериментальные модели, разработанные и применённые нами для изучения TIR доменов высших животных, были с успехом применены независимыми группами для изучения бактериальных TIR доменов, а также других белков (Atamas et al., 2025; Ke et al., 2016; Kwon et al., 2019; Shah et al., 2020).

Публикации.

Статьи в рецензируемых научных журналах 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, no. 3. – pp. 1477-1482..
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- β -induced STAT1-dependent gene expression in macrophages // *Nature Immunology*. – 2002. – vol. 3, no. 4. – pp. 392-398.
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, no. 3. – pp. 169-175.

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, no. 25. – pp. 22506–22512.
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 // *Journal of Immunology*. – 2005. – vol. 175, no. 1. – pp. 494-500.
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, no. 7. – pp. 1035-1050.
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 // *Journal of Immunology*. – 2007. – vol. 178, no. 5. – pp. 2655-2660.
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, no. 36. – pp. 24314-24325.
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 // *Journal of Immunology*. – 2011. – vol. 186, no. 8. – pp. 4819-4827.
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, no. 29. – pp. 24641-8.

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(a). – vol. 110, no. 47. – pp. 19036-19041.
12. Piao W., Vogel S.N., **Toshchakov V.Y.** Inhibition of TLR4 signaling by TRAM-derived decoy peptides in vitro and in vivo // *Journal of Immunology*. – 2013(b). – vol. 190, no. 5. – pp. 2263-2272.
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, no. 1. – pp. 30-36.
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, no. 4. – pp. 046017.
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, no. 12. – pp. 1941-1952.
16. Piao W., Ru L.W., **Toshchakov V.Y.** Differential adapter recruitment by TLR2 co-receptors // *Pathogens and Disease*. – 2016. – vol. 74, no. 5. – ftw043. DOI: 10.1093/femspd/ftw043.
17. Javmen A., Szmazinski H., Lakowicz J.R., **Toshchakov V.Y.** Blocking TIR Domain Interactions in TLR9 Signaling // *Journal of Immunology*. – 2018. – vol. 201, no. 3. – pp. 995-1006.
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, no. 6. – pp. 1697-1706.
19. **Toshchakov V.Y.**, Neuwald A.F. A survey of TIR domain sequence and structure divergence // *Immunogenetics*. – 2020. – vol. 72, no. 3. – pp. 181-203.

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, no. 1. – pp. 35-47.
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 // *Journal of Experimental Medicine*. – 2021. – vol. 218, no. 2. – e20200675. doi: 10.1084/jem.20200675.
22. Javmen A., Zou J., Nallar S.C., Szmackinski H., Lakowicz J.R., Gewirtz A.T., **Toshchakov V.Y.** TLR5-derived, TIR-interacting decoy peptides to inhibit TLR signaling // *Journal of Immunology*. – 2023. – vol. 210, no. 9. – pp. 1419-1427.
23. **Тоцаков В.Ю.** Пептидные блокаторы индуцированных взаимодействий сигнальных белков: текущее состояние и перспективы развития // *Биохимия*. – 2024. – Т. 89, № 5. – С. 755-771.
23. **Toshchakov V.Y.** Peptide-Based Inhibitors of the Induced Signaling Protein Interactions: Current State and Prospects // *Biochemistry (Moscow)*. – 2024. – vol. 89, no. 5. – pp. 784-798.
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 // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2025. – vol. 392, no. 1. – pp. 100008. doi: 10.1124/jpet.123.002050.

Патенты:

1. Fenton M.J., Vogel S.N., Toshchakov V. (2006). New isolated blocking peptide comprises BB-loop sequence of a Toll-like receptor (TLR), preferably of a Toll-like receptor-4 (TLR4) adapter protein, useful for preventing or treating

inflammatory disease, e.g. contact dermatitis. Patent Number(s): WO2006113530-A2; WO2006113530-A3; US2010069297-A1.

2. Toshchakov V. (2015). Inhibitors of TLR signaling by targeting TIR domain interfaces. US Patent 8,940,703.
3. Toshchakov V. (2016). Inhibitors of TLR signaling by targeting TIR domain interfaces. US Patent 9,309,287.
4. Toshchakov V., Javmen A. (2024). TLR9 inhibitors to suppress inflammatory response to pathogens. US Patent US12084521B2.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Функциональность и распространение TIR доменов в биосфере.

TIR домены представлены во всех доменах биоты. TIR домены обнаруживаются как в белках бактерий и архей, так и во всех царствах эукариот: в простейших, растениях, грибах и животных (Toshchakov & Neuwald, 2020). Наиболее распространённая функция TIR доменов — это участие в передаче внутриклеточных сигналов в качестве ДВБ (Pawson & Nash, 2003). Впервые TIR домены были обнаружены как гомологичный участок белка дрозофилы Toll и рецептора интерлейкина 1 человека (Gay & Keith, 1991). Позднее TIR домены были обнаружены в белках устойчивости растений, называемых R белками (от английского Resistance proteins) (Whitham et al., 1994), — рецепторах, которые активируются в присутствии фитопатогенов и индуцируют программированную смерть инфицированных клеток (Spoel & Dong, 2012; Van der Biezen & Jones, 1998). TIR домены также присутствуют в Toll-подобных рецепторах (TLR), — семействе белков системы врождённого иммунитета животных и человека (Janeway & Medzhitov, 2002; Medzhitov et al., 1997; Poltorak et al., 1998; Rock et al., 1998). TLR активируются молекулами, характерными для широких групп патогенов, но в норме отсутствующими в организме хозяина. Примерами природных активаторов TLR являются LPS грамотрицательных бактерий (активатор TLR4), липопептиды и пептидогликаны грамположительных бактерий (активаторы TLR2), белок жгутиковых бактерий флагеллин (TLR5), а также различные нуклеиновые кислоты микробной природы, такие как двуцепочечная РНК (TLR3), одноцепочечная вирусная РНК (TLR7 и TLR8) или неметилованная бактериальная ДНК, обогащённая CpG мотивами (TLR9). TLR также могут активироваться эндогенными молекулами, в норме не присутствующими в организме хозяина, но появляющимися при повреждении различной природы (Ma et al., 2024). Активаторы TLR

микробного или эндогенного происхождения оказывают провоспалительное действие. Адаптерные белки, функционирующие в связке с TLR, также содержат TIR домены (Janeway & Medzhitov, 2002; Medzhitov et al., 1997; Poltorak et al., 1998; Rock et al., 1998).

Подавляющее большинство TIR-содержащих белков животных функционирует в качестве компонентов системы иммунитета, осуществляющих первичное распознавание вирусов, одноклеточных патогенов, а также паразитов, с последующей индукцией и регуляцией механизмов противоинфекционной защиты (Kawai & Akira, 2011). Белки Toll насекомых, в дополнение к их роли в осуществлении механизмов врождённого иммунитета, ответственны за дорзовентральную поляризацию и специализацию сегментов в раннем эмбриогенезе (Anderson et al., 1985; Chin Chiang & Beachy, 1994; Lemaitre et al., 1996).

TIR домены белка SARM1 уникальны среди TIR доменов животных в том, что они обладают каталитической активностью. TIR домен активированного SARM1 способен катаболизировать НАД, посредством чего вызывается Валлерианова дегенерация аксонов при травме (Essuman et al., 2017). Интересно, что белки устойчивости растений, а также некоторые TIR-содержащие белки бактерий и архей, могут индуцировать локальную гибель инфицированных клеток сходным механизмом, вызывая деградацию пула НАД (Essuman et al., 2018; Horsefield et al., 2019; Wan et al., 2019). Это наблюдение указывает на раннее возникновение НАДазной активности TIR доменов в биологической эволюции. Растительные TIR домены осуществляют антимикробную защиту не только посредством прямого механизма abortивной инфекции за счёт деградации НАД, но и опосредованно, через вторичные механизмы за счёт продукции спектра нуклеотидных мессенджеров, образуемых при катаболизме НАД (Bayless et al., 2023; Bayless & Nishimura, 2020; Lapin et al., 2022; Maruta et al., 2023).

TIR домены широко распространены среди бактерий (Toshchakov & Neuwald, 2020; Ve et al., 2015). Бактериальные TIR домены структурно

разнообразны и, вероятно, выполняют широкий спектр функций, большинство из которых не изучено к настоящему времени (Toshchakov & Neuwald, 2020). Примерами изученной функциональности бактериальных TIR доменов является НАДазная активность TIR-содержащих белков антифагальных систем Argonaute и Thoeris, ответственная за элиминацию инфицированных бактерий и реализацию антивирусной защиты популяции посредством абортной инфекции (Koorpal et al., 2022; Ofir et al., 2021; Wein & Sorek, 2022). TIR домены белков некоторых бактериальных патогенов способны связываться с TIR доменами многоклеточных и таким образом подавлять их антибактериальные функции (Cirl et al., 2008; Rana et al., 2013; Salcedo et al., 2008, 2013; Snyder et al., 2013). Широкое распространение TIR доменов среди бактерий, однако, позволяет предположить существование ещё не изученных функций TIR доменов, не связанных с подавлением антимикробной защиты высших животных патогенными микроорганизмами или суицидом инфицированных вирусами бактерий посредством активного катаболизма НАД (Toshchakov & Neuwald, 2020). Вполне вероятно, что многие бактериальные TIR домены функционируют в качестве ДВБ в ещё не охарактеризованных сигнальных путях.

2.2 Структура TIR доменов.

Структура TIR доменов была впервые точно предсказана одновременно с открытием и клонированием первых пяти членов семейства Толл-подобных рецепторов (Rock et al., 1998). Основываясь на анализе 21 известной на то время последовательности TIR доменов, включая домены 5-ти вновь открытых TLR, Rock и соавторы определили, что TIR домены принадлежат к классу α/β белков. Вторичная структура белковых доменов такого класса состоит из чередующихся β -тяжей и α -спиралей, которые вместе формируют окруженный спиралью β -лист с параллельной укладкой тяжей (Levitt & Chothia, 1976; Финкельштейн & Птицын, 2005). TIR домен типичной структуры состоит из 5 тяжей и 5 спиралей (Rock et al., 1998;

Toshchakov & Neuwald, 2020; Xu et al., 2000) (Рис. 4). Анализ гидрофобности тяжей позволил предположить, что второй и пятый тяжи, тяжи В и Е, формируют края β -листа (Rock et al., 1998) (Рис. 4). Последующее экспериментальное определение первых двух структур TIR доменов (TIR доменов TLR1 и TLR2 человека) полностью подтвердило выводы, сделанные на основании биоинформационного анализа (Xu et al., 2000). Полученные модели подтвердили общую укладку, положение краевых тяжей, а также то, что спирали αA и αE располагаются на вогнутой стороне листа, тогда как спирали В, С и D формируют полусферу домена, прилегающую к выпуклой стороне листа (Рис. 4в).

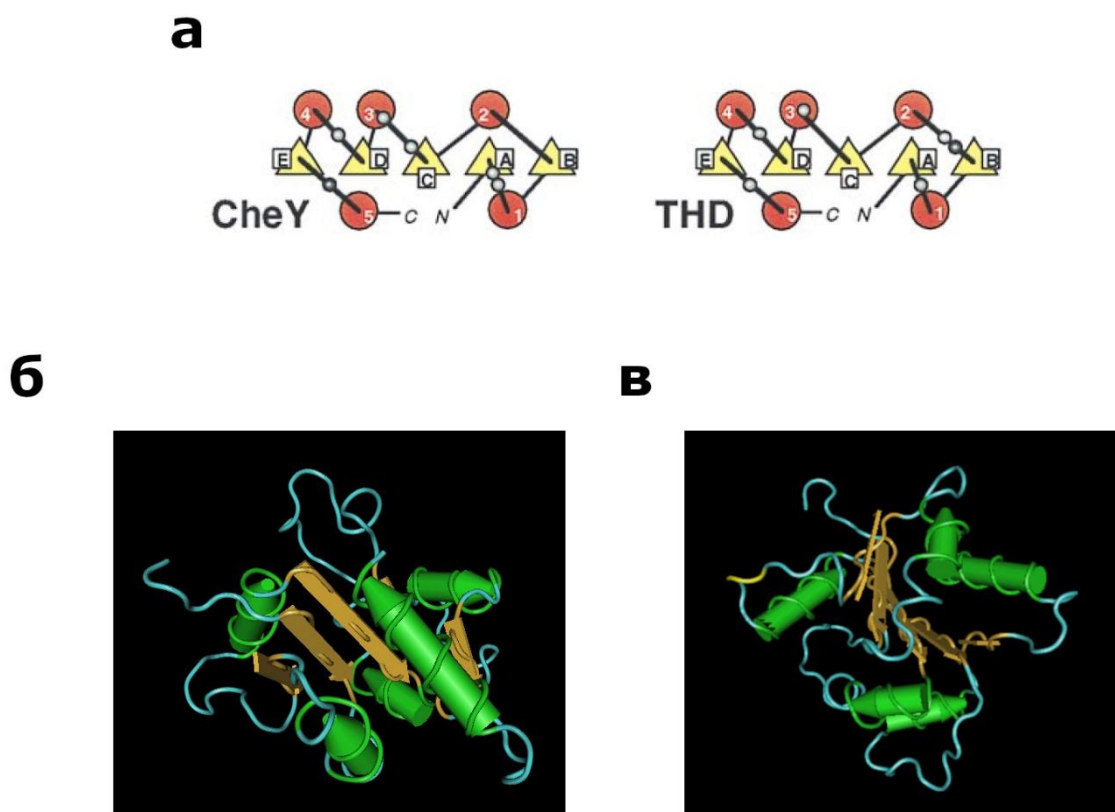


Рисунок 4 — Структура TIR доменов

а – схематическое изображение укладки бактериального белка CheY (слева) и TIR доменов, предсказанное на основании анализа первых известных последовательностей (Rock et al. 1998).

б и **в** – кристаллографическая модель TIR домена TLR2, представленная в двух проекциях (Xu et al. 2000).

К моменту написания этого раздела диссертации Коллаборативный Банк Белковых Структур (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (www.rcsb.org)) (КББС) содержал экспериментально определённые структурные модели более десятка TIR доменов неортологичных белков (Berman et al. 2000). Анализ имеющихся на настоящее время структур подтверждает общность укладки TIR доменов: все известные структуры имеют центральный параллельный β -лист, составленный из 5-ти тяжей и окружённый 5-тью спиральными участками. Различия между TIR доменами выражаются в различных конфигурациях спиральных участков, более выраженных в С-концевых участках домена, а также в длине тяжей и в аминокислотных мотивах, формирующих поверхность домена (Toshchakov and Neuwald 2020).

2.3 TIR домен-содержащие белки, вовлечённые в индукцию и регуляцию иммунного ответа человека

Представленные к защите исследования фокусировались на TIR доменах TLR, а также адаптерных белков, осуществляющих передачу сигнала с этих рецепторов. Геном человека кодирует 10 TLR. TLR1, 2, 4–6 и 10 экспрессируются на плазматической мембране клеток, тогда как TLR3 и 7–9 располагаются на мембранах эндосом (Blasius and Beutler 2010; Kawai and Akira 2011). TLR 3–5 и 7–9 функционируют как гомодимеры. TLR2, напротив, не образует функциональных гомодимеров (Ozinsky et al. 2000). Этот рецептор способен инициировать передачу сигнала, гетеродимеризовавшись с TLR1, 6, или 10 (Ozinsky et al. 2000; Kawai and Akira 2011). 4 TIR-содержащих адаптерных белка участвуют в передаче сигнала с активированных TLR: MyD88, TIRAP (также называемый Mal), TRIF и TRAM (последние также известны под именами TICAM1 и TICAM2) (Hultmark 1994; Fitzgerald et al. 2001; Horng et al. 2001; Oshiumi et al. 2003a, 2003b; Yamamoto et al. 2003a, 2003b; Deguine and Barton 2014). MyD88

участвует в передаче сигнала со всех TLR за исключением TLR3 (Kawai and Akira 2011). Этот адаптерный белок состоит из двух доменов взаимодействия белков (ДВБ): TIR домена и домена (клеточной) смерти (ДС). TIR домены MyD88 ответственны за взаимодействие этого белка с активированным (димеризованным) рецептором и последующую стадию увеличения первичного комплекса посредством как рецептор-адаптерных, так и гомо- и гетеротипических адаптер-адаптерных TIR-TIR взаимодействий (Ve et al. 2017; Javmen et al. 2018; Toshchakov and Javmen 2020; Clabbers et al. 2021). ДС осуществляют последующий этап формирования MyD88-зависимого сигнального комплекса, Миддосомы. Домены смерти MyD88 рекрутируют серин-треониновые киназы семейства IRAK (Interleukin-1 Receptor Associated Kinase) за счёт индуцированной олигомеризации доменов смерти MyD88 и их взаимодействия с доменами смерти IRAK (Lin et al. 2010).

TIRAP играет вспомогательную роль в отношении рекрутирования адаптера MyD88. На основании ранних данных, полученных с использованием генетически модифицированных мышей, дефицитных по гену TIRAP, было сделано заключение, что TIRAP играет существенную роль в передаче сигнала только с TLR2 и TLR4 (Horng et al. 2002; Yamamoto et al. 2002a). Последующие исследования, однако, показали, что хотя дефицитные по гену TIRAP мыши способны отвечать на агонисты TLR7 и TLR9, передача сигнала с этих рецепторов существенно усиливается в присутствии TIRAP (Bonham et al. 2014; Piao et al. 2015). Эти наблюдения подтверждаются данными структурной биологии, показывающими, что присутствие TIRAP инициирует олигомеризацию TIR доменов MyD88, причём образующаяся структура аналогична двуцепочечным филаментозным структурам, спонтанно формируемым рекомбинантными TIR доменами TIRAP в растворе (Clabbers et al. 2021; Nimma et al. 2021). Способность TIR доменов TIRAP индуцировать олигомеризацию MyD88 вместе с выраженной специфичностью по отношению к TLR2 и TLR4

показывает двойственную функциональную роль TIR доменов TIRAP, которые важны как для взаимодействия с TIR доменами активированных TLR2 и TLR4, так и для стимуляции олигомеризации MyD88 за счёт прямых взаимодействий TIR доменов TIRAP и MyD88.

Белок TRIF является единственным известным адаптером, ответственным за передачу сигнала с TLR3 (Yamamoto et al. 2002b, 2003b; Oshiumi et al. 2003a). Кроме того, этот адаптер участвует в передаче сигнала с TLR4 (Yamamoto et al. 2002b, 2003b). В отличие от TLR3, участие TRIF в передаче сигнала с TLR4 опосредовано присутствием дополнительного вспомогательного адаптера, называемого TRAM или TICAM2 (Fitzgerald et al. 2003; Oshiumi et al. 2003b; Yamamoto et al. 2003b). TLR-зависимая активация TRIF индуцирует группу так называемых «MyD88-независимых» генов, способствующих активации противовирусного иммунитета (Kawai and Akira 2011). Эта группа MyD88-независимых, TRIF-зависимых генов, индуцируемых при активации TLR, включает в себя интерфероны первого типа, а также некоторые хемокины (Toshchakov et al. 2002; Fitzgerald et al. 2003). Способность адаптера TRIF активировать расширенный набор цитокинов обусловлена активацией дополнительных факторов транскрипции. В дополнение к факторам семейства NF-κB, активируемых посредством MyD88-зависимого пути, TRIF-зависимый путь передачи сигнала активирует транскрипционные факторы семейства IRF (Interferon Regulatory Factors (Факторы Регуляции Интерферонов)), IRF3 и IRF7, посредством чего вызывается экспрессия интерферонов первого типа, а также некоторых хемокинов (Fitzgerald et al. 2003; Jefferies 2019).

2.4 Функционально значимые мутации TIR доменов млекопитающих

Одним из широко используемых подходов к изучению функции белков является анализ влияния аминокислотных замен на функцию изучаемого

белка. Изучение TIR доменов проводилось как с использованием направленного мутагенеза их аминокислотных последовательностей, так и изучения спектра встречающихся в природе мутаций. Первая функционально значимая мутация TIR домена была обнаружена у мышей линии C3H/HeJ (Poltorak et al., 1998). Отличительной чертой этой линии являлась полная неспособность мышей отвечать на LPS грамотрицательных бактерий (Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999). Мутация, ответственная за нечувствительность этих мышей к LPS, локализовалась в гене, кодирующем *Tlr4* и заключалась в одноаминокислотной замене P712H, расположенной в петле BB TIR домена этого рецептора (Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999). Следует отметить, что позиция P712 консервативна в последовательностях TIR доменов TLR, рецепторов семейства IL-1R, а также в адаптерных белках, участвующих в передаче сигнала с этих рецепторов (Slack et al., 2000; Toshchakov & Neuwald, 2020). Направленный мутагенез пролина в других TIR-содержащих белках в позициях, гомологичных P712 мышинового TLR4, также вызывал утрату функции белков-носителей данной мутации (Du et al., 1999; Fitzgerald et al., 2003; Horng et al., 2001; Underhill et al., 1999). Важно отметить, что мутации в этой позиции, несмотря на полное подавление функции белка-носителя, не вызывали значительных структурных изменений в общей укладке TIR домена (Xu et al., 2000), что определённо указывало на важность этого сайта для межбелковых взаимодействий.

Влияние аминокислотных замен на функционирование TIR домена TLR4 экстенсивно изучалось в исследовании Ronni et al. (Ronni et al., 2003). Авторы систематически мутировали последовательность TIR домена, сгенерировав 60 изменённых последовательностей. Внедрённые модификации включали одно-, двух- и трёх-аминокислотные аланиновые замены, которые были распределены по всей длине домена. Также были внедрены 3 стоп-кодона, которые отсекали либо спираль E вместе с петлёй EE, либо спираль E без петли EE, либо часть спирали E. Мутированные

TIR домены вместе с трансмембранным сегментом рецептора были слиты со спонтанно димеризующимся эктодоменом CD4, полученные конструкции трансфицировались в клетки линии 293Т, и функция мутированных TIR доменов изучалась с помощью набора репортерных плазмид. Тестирование показало, что почти половина из сгенерированных мутаций (29 из 60) вызывали снижение функции TIR домена более чем на 80%, причём мутации, вызывающие повреждение, не были локализованы в определённом участке, а располагались по всей длине аминокислотной последовательности, (Ronni et al., 2003). Вызывающие значительное повреждение функции мутации располагались в следующих регионах TIR домена: на границе N-концевого тяжа A и участка, соединяющего TIR с трансмембранной спиралью (YD674-675AA); в β -тяже A (FVI677-679AAA); в петле AB (NLE695-697AAA); в β -тяже B (LCL705-707AAA); 4 мутации в петле BB (HYR708-710AAA, DFI711-713AAA, PGV714-716AAA и I718A); в α -спирали B (II722-723AA, E725A, GF726-727AA, K729A и SRK730-732AAA); в β -тяже C (VIV733-735AAA и VVS736-738AAA); в третьем спиральном участке (SR744-745AA и YE751-752AA); в β -тяже D (GI765-766AA и IFI767-769AAA); в петле DD (EK775-776AA); в α -спирали D (QQ781-782AA); в β -тяже E и петле EE (TY793-794AA, EWE796-798AAA); а также в α -спирали E (FWR807-809AAA, RLR810-812, LR811-812 и L815A). Вставка стоп-кодонов в позиции Y794STOP (петля EE) и R809STOP (α -спираль E), но не в позиции W821STOP, блокировали функцию TIR домена (Ronni et al., 2003).

Аналогичный методический подход, заключающийся в экстенсивном направленном мутагенезе последовательности TIR домена, применили Lin и соавторы для изучения адаптера TIRAP (Lin et al., 2012). Авторы изучили влияние 35 одноаминокислотных аланиновых замен в последовательности TIR домена TIRAP на его способность активировать NF- κ B-репортерную плазмиду и связывать другие TIR домены (Lin et al., 2012). 14 из протестированных мутированных белков характеризовались сниженной на

более чем 50% способностью активировать репортер. Такое существенное снижение способности активировать NF-κB вызывали следующие аминокислотные замены: Y86A и D87A (эти аминокислотные располагаются на границе N-концевого тяжа A и не структурированного участка TIRAP и гомологичны описанным выше мутациям YD674-675AA TIR домена TLR4); E108A (α-спираль B); R115A, F117A, L118A и R121A, D122A, P125A, P125H и I129A (эти позиции соответственно гомологичны β-тяжу B и петле BB других TIR доменов); а также W156A, Y159A и L165A, располагающиеся в третьем спиральном участке. Можно отметить, что структурное положение вызывающих снижение функции аминокислотных замен при мутировании TIR доменов TLR4 и TIRAP в значительной мере перекрывалось. Авторы также показали, что замена P125A вызывает существенно меньшее снижение функции TIR домена в сравнении с P125H, что дополнительно указывало на стерическое препятствие межбелковому взаимодействию в районе петли BB как на причину более выраженной потери функции при замене пролина на гистидин (Lin et al., 2012). Резюмируя данные исследований, использующих экстенсивный мутагенез TIR доменов, можно констатировать, что несмотря на то что авторам обоих исследований не удалось однозначно картировать сайты функциональных TIR-TIR взаимодействий ни для TIR домена TLR4, ни для TIRAP, оба исследования указывали на существование множества сайтов TIR-TIR взаимодействий в структуре доменов (Ronni et al., 2003; Lin et al., 2012). Причинами невозможности однозначно интерпретировать результаты экспериментов с направленным мутагенезом являлись как неизвестная архитектура первичного сигнального комплекса, так и невозможность исключить влияния некоторых из изученных мутаций на общую укладку TIR домена.

Фенотипические проявления мутации P712H TIR домена TLR4, помимо нечувствительности к летальным дозам LPS грамотрицательных бактерий, включают повышенную чувствительность мышей к инфицированию *Salmonella typhimurium* и другими грамотрицательными бактериями

(Hagberg et al., 1984; O'Brien et al., 1980). Вместе с тем отмечалось, что природные и искусственно индуцированные мутации TLR, вызывающие выраженное снижение ответа на специфические агонисты в экспериментальных условиях, имеют относительно слабые фенотипические проявления в отношении чувствительности носителя к различным патогенам (Smirnova et al., 2001). Так, уже в ранней работе было показано, что делеция *Tlr2* повышает чувствительность только к высоким дозам патогена *Staphylococcus aureus*, тогда как ответ на низкие дозы патогена остаётся нормальным (Takeuchi et al., 2000). Анализ ассоциации спектра природного полиморфизма TLR4 и других TLR с инфекционными и другими заболеваниями также не выявил прямых причинно-следственных связей. Обнаруженные ассоциации носят скорее корреляционный характер, а ретроспективный анализ публикаций обнаружил противоречивые данные, что, по всей вероятности, является следствием малых проанализированных выборок (Medvedev, 2013; O'Neill et al., 2009; Schröder & Schumann, 2005).

Среди других описанных в литературе, проявляющих себя функционально природных мутаций TIR доменов следует привести 4 мутации, обнаруженные при секвенировании экзонов пациентов, попавших в блок интенсивной терапии вследствие тяжелого течения коронавирусной инфекции COVID-19 (Made et al., 2020; Fallerini et al., 2021). Мутации обнаруживались в гене TLR7 (этот ген располагается в X хромосоме) у мужчин зрелого возраста, у которых до попадания в реанимацию вследствие тяжелого течения COVID-19, не обнаруживалось каких-либо проявлений склонности к инфекционным заболеваниям. Три из обнаруженных мутаций TLR7 (S301P, R920K и A1032) характеризовались потерей функции белка, тогда как четвёртый вариант не экспрессировался (Fallerini et al., 2021). Одна из мутаций, вызывающих полную потерю функции белка, локализовалась в TIR домене и представляла собой однокислотную замену A1032T в α -спирали E (Fallerini et al., 2021; Mantovani

et al., 2022). Моноциты крови пациентов-носителей A1032T утрачивали способность продуцировать интерфероны первого и второго типа в ответ на стимуляцию клеток имихимодом (Fallerini et al., 2021; Mantovani et al., 2022). Утрата интерферонового ответа на присутствие одноцепочечной вирусной РНК и расценивалась как причина тяжелого течения COVID-19 у носителей мутированного TLR7 (Fallerini et al., 2021; Mantovani et al., 2022).

Относительная слабость фенотипических проявлений недостаточности отдельных TLR, или проявление недостаточности только при инфицировании редкими или вновь возникшими патогенами, по всей видимости, происходит за счёт функциональной избыточности семейства TLR при заражении большинством инфекционных агентов. Поскольку патогены в типичном случае содержат молекулы, способные активировать несколько TLR, функциональная недостаточность одного рецептора может компенсироваться за счёт функции других членов семейства. Непрямым свидетельством в пользу последнего тезиса является то, что мутации белков, участвующих в передаче сигнала с подгруппы TLR (примером таких белков являются адаптерные белки или киназы MyD88-зависимого сигнального пути), вызывают гораздо более серьёзные фенотипические проявления. Так, Bernuth и соавторы сообщили о 9 клинических случаях, ассоциированных с генетическими дефектами адаптера MyD88 (Bernuth et al., 2008). Клиническая картина этих пациентов характеризовалась тяжело протекающими гнойными бактериальными инфекциями, периодически возникающими в детском возрасте. Вместе с пониженной устойчивостью к пневмококкам и ограниченному числу других бактериальных и вирусных патогенов, отмечалось, что пациенты демонстрировали близкую к нормальной устойчивость к большинству инфекций, а также то, что частота и тяжесть рецидивов становилась менее выраженной по достижении пациентами взрослого возраста (Bernuth et al., 2008; 2012). Были выявлены три мутации в белковой последовательности MyD88 у пациентов с описанной выше симптоматикой. Две мутации располагались в ДС домене

MyD88 (делеция E53 и замена L93P), а третья в петле BB TIR домена. Все три мутации были рецессивны, и клиническая картина развивалась только у индивидуумов, гомозиготных по любому из мутированных аллелей или несущих 2 различных варианта изменённого гена (Bernuth et al., 2008). Схожая до деталей клиническая картина наблюдалась и у пациентов, несущих нулевые аллели гена IRAK4, серин-треониновой киназы, рекрутируемой к MyD88 и ответственной за передачу сигнала при активации MyD88-зависимого сигнального пути (Picard et al., 2003; 2007).

Успехи в секвенировании последних лет привели к идентификации огромного числа ранее неизвестных вариантов генов. Например, в базе данных UniProt на момент написания этого раздела диссертации была представлена информация о 1141 варианте последовательности TLR4 человека (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/O00206/variant-viewer>) (UniProt Consortium, 2015). 253 из этих вариантов кодируют белки с изменением в последовательности TIR домена. Интересно, что мутация P714H, которая гомологична мутации гена *Tlr4* у мышей линии C3H/HeJ, присутствует и в популяции *Homo sapiens*, однако частота встречаемости аллеля, кодирующего этот вариант белка, согласно текущей оценке, крайне низка (AF: 6.93e-7) (UniProt Consortium, 2015).

Помимо вариантов TIR доменов, характеризующихся снижением функции, известны и варианты, которые проявляют большую склонность к спонтанной олигомеризации в сравнении с вариантами дикого типа. Экспрессия таких вариантов белков, участвующих в передаче сигнала с TLR или рецепторов семейства IL-1R, ведёт к сигнал-независимой активации сигнальных путей. Наиболее изученным примером такой мутации является замена L265P в TIR домене MyD88. Ngo и соавторы обнаружили, что L265P вариант MyD88 экспрессируется с высокой частотой у пациентов с подтипом диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, который характеризуется фенотипом активированных В-клеток (activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma (ABC DLBCL)), но не

обнаруживался при других подтипах DLBCL (Ngo et al., 2011). Позднее высокая частота встречаемости мутации L265P в TIR домене MyD88 была обнаружена и при других формах рака (Bonzheim et al., 2015; Chapuy et al., 2016; Kraan et al., 2013, 2014; Montesinos-Rongen et al., 2012; Treon et al., 2012). Молекулярный механизм онкогенного действия мутации L265P заключается в спонтанной олигомеризации мутантной формы MyD88, ведущей к активации MyD88-зависимого сигнального пути с последующей активацией NF- κ B и JAK-STAT в опухолевых клетках, что и оказывает антиапоптотическое действие на клетки опухоли (Avbelj et al., 2014; Ngo et al., 2011; Yang et al., 2013).

Анализ структур TIR домена MyD88, представленных в базе данных RCSB PDB (<https://www.rcsb.org>), показывает, что L265 располагается в N-концевой части β -тяжа D и минимально экспонирован на поверхности домена (поверхностная экспозиция данного остатка меньше 8%). Боковая цепь L265 контактирует с аминокислотными остатками L281 и I284, располагающимися в районе петли, соединяющей 4-й и 5-й тяжи. Контактирующие друг с другом L265, L281 и I284 образуют значительную часть гидрофобной сердцевины домена, располагающуюся на выпуклой стороне β -листа, ближе к его С-концу, и которая должна вносить существенный вклад в обеспечение структурной стабильности участка между 4-м и 5-м тяжами. Замена L265P, таким образом, должна деформировать, либо дестабилизировать значительный участок поверхности домена, располагающийся между спиралью C и поверхностно расположенным β -тяжом E (PDB ID: 7L6W; Berman et al., 2000; Clabbers et al., 2012), что и может объяснить повышенную склонность мутированной формы домена к спонтанной олигомеризации.

Резюмируя, можно констатировать, что как данные, полученные с помощью направленного мутагенеза, так и анализ природных вариантов TIR-содержащих белков, указывают на множественность сайтов,

обеспечивающих взаимодействия TIR доменов. Однако, понять архитектуру активирующих комплексов и точно предсказать положение функционально значимых сайтов взаимодействия не представляется возможным исходя из данных направленного или природного мутагенеза. Мутации TIR доменов TLR, нарушающие функцию доменов, достаточно редко проявляются фенотипически, но могут снижать устойчивость носителей к редким или новым патогенам. Относительная редкость фенотипического проявления мутаций TIR доменов TLR объясняется их рецессивным характером, а также способностью других членов семейства компенсировать потерю функции одного из членов за счёт чувствительности семейства в целом к широкому спектру патоген-ассоциированных молекул. В сравнении с мутациями отдельных членов семейства TLR, мутации TIR доменов адаптерных белков, участвующих в передаче сигнала с группы TLR, имеют более тяжёлые иммунологические последствия, вызывая более существенное ослабление противоинфекционного иммунитета. Помимо нарушения способности TIR доменов взаимодействовать друг с другом, мутации могут оказывать и противоположное действие, вызывая повышенную склонность к агрегации. Присутствие мутаций такого рода ведёт к спонтанной активации сигнального пути. Примером активирующей мутации является замена L265P. Соматическая мутация L265P часто обнаруживается в опухолевых клетках и может являться причиной опухолевого роста.

2.5 Концепция блокирующих пептидов как инструмента выявления структуры сигнальных комплексов

Многочисленные примеры, подробно разобранные в нашем недавнем обзоре (Тощакوف, 2024; Toshchakov, 2024) показывают, что относительно короткие пептиды, соответствующие линейному участку первичной белковой последовательности, формирующему сайт функционально значимого белок-белкового взаимодействия, способны блокировать

функцию белка-прототипа. Механизм действия таких пептидов, зачастую называемых блокирующими пептидами (БП) или пептидами-приманками (от английского decoy peptides), заключается в том, что блокирующий пептид связывает и блокирует сайты взаимодействия белка-прототипа с белками-партнёрами, таким образом предотвращая формирование функционально значимого комплекса и, как следствие, ингибируя подлежащую функцию (Рис. 5).

Первые успешные попытки модулировать биологические функции с помощью синтетических БП можно отнести к 90-м годам прошлого века. Мишенью первых экспериментальных работ были внеклеточные взаимодействия белков. Так, различные варианты пептидов, содержащих связывающий интегрины мотив (-RGD-), использовались в качестве агентов для блокировки клеточной адгезии в попытках разработки инновационных на то время медицинских препаратов (Goligorsky et al., 1998). Другим ранним примером реализации концепции блокирования функциональных взаимодействий белков является ингибирование протеинкиназы Akt пептидами-псевдосубстратами, а также пептидом, содержащим тяж β A взаимодействующего с Akt белка TCL1 (Hiromura et al., 2004; Luo et al., 2004). Пептиды, блокирующие олигомеризацию NEMO (nuclear factor kappa-B (NF- κ B) essential modulator), а также пептиды, соответствующие NEMO-связывающему домену IKK, снабженные проникающим в клетки вектором, ингибировали активацию NF- κ B, индуцированную TNF или LPS (Agou et al., 2004; Choi et al., 2003; May et al., 2000). В исследовании Borsello et al. использовался пептид, состоящий из векторной последовательности белка Tat вируса иммунодефицита человека в сочетании с JNK-связывающим мотивом белка, взаимодействующего с JNK 1 (JNK interacting protein 1) (Borsello et al., 2003). Интересно, что как L-, так и D-изомеры этого пептида блокировали киназную активность JNK и оказывали нейропротекторное действие в моделях ишемии мозга (Borsello et al., 2003). Другим примером белкового сегмента, блокирующего активность митоген-

активируемых протеинкиназ (МАПК), является участок последовательности киназы MEK1 (13 аминокислотных остатков), который эффективно ингибировал активность киназ ERK (Keleman et al., 2002). Примером успешной реализации концепции блокирующих пептидов в отношении рецепторов, сопряженных с G-белком, является пептид, включающий С-концевой сегмент белка $G\alpha_s$ в связке с пенетратином. Этот пептид специфически ингибировал продукцию cAMP, стимулированную агонистами адренорецепторов (D'Ursi et al., 2006).

Значительное количество исследований было посвящено разработке ингибиторов TLR. Horng et al. были первыми, кто использовал синтетические проникающие пептиды для ингибирования TLR. Авторы показали, что пептид, состоящий из BB-петли (петля между вторым тяжом и второй α -спиралью) TIR домена адаптерного белка TIRAP в связке с пенетратином, блокирует индуцированную LPS активацию NF- κ B и MAP-киназ в макрофагальной линии клеток. Этот пептид, однако, не проявлял подобной активности при стимуляции клеток агонистом TLR9 или IL-1 (Horng et al., 2001). TIRAP-пептид также селективно блокировал TLR4-зависимую продукцию цитокинов и созревание дендритных клеток (Horng et al., 2001).

Поскольку сборка сигнальных комплексов является внутриклеточным процессом, помимо сегмента, имитирующего сайт связывания на белке-прототипе, функциональный блокатор сборки сигнального комплекса должен содержать сегмент, обеспечивающий проникновение всей конструкции в клетку. В качестве агента, обеспечивающего трансмембранный перенос блокатора, наиболее часто используются пептидные векторы, взятые либо из натуральных белков, обладающих способностью проникать через плазматические мембраны клеток, либо искусственно созданные аминокислотные последовательности. Пептидные блокаторы белковых взаимодействий, таким образом, состоят из двух функциональных частей: специфической части, обеспечивающей

связывание с белками-мишенями, и пептидного вектора, необходимого для проникновения всей конструкции в клетку.

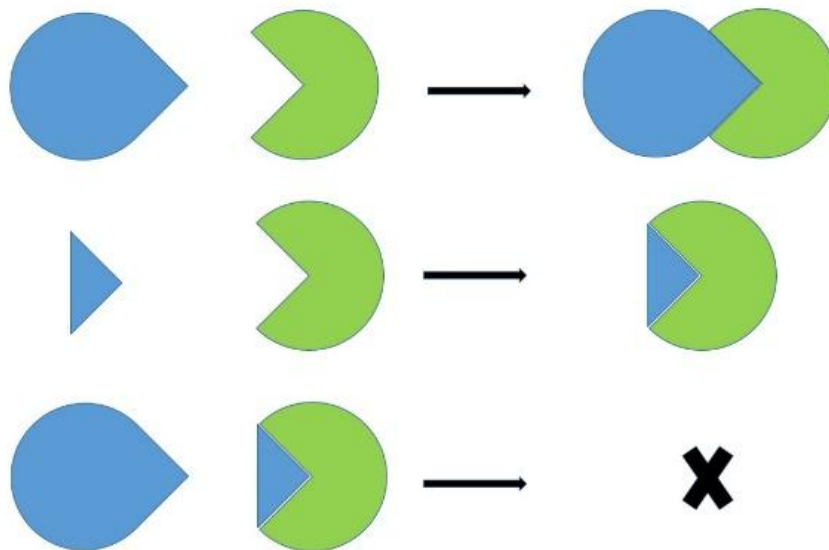


Рисунок 5 — Механизм действия блокирующих пептидов — предотвращение формирования белкового комплекса за счёт конкуренции с белком-прототипом за функциональный сайт связывания

В случаях, когда сайт взаимодействия белка известен, первичный дизайн блокирующей части пептида представляется очевидным – в таких случаях используется сегмент белковой последовательности, образующий бóльшую часть таргетируемого сайта. В случаях, когда границы сайтов взаимодействия не известны точно, ингибирующие последовательности могут определяться путём скрининга библиотек пептидов, или же подбираться эмпирически. При эмпирическом выборе блокирующего сегмента или при дизайне библиотеки пептидов следует учитывать структурную информацию о локализации сегмента (располагается ли сегмент поверхностно или же образует сердцевину домена), а также принимать во внимание типичные размеры сайтов, осуществляющих транзиторные взаимодействия сигнальных белков. Общие характеристики

сайтов взаимодействий белков достаточно хорошо изучены и описаны в серии исследований (Jones and Thornton 1996; Conte et al. 1999; Nooren and Thornton 2003; Chen et al. 2013). Анализ известных структур сигнальных комплексов, образованных ДВБ, подтверждает общие закономерности и уточняет, что площадь бинарных взаимодействий в таких комплексах находится в нижней половине диапазона размеров сайтов взаимодействия белков в транзиторных комплексах и составляет 250–800 Å² (Park et al. 2007; Lin et al. 2010; Ve et al. 2017; Clabbers et al. 2021). Принимая во внимание то, что циркулярность сайтов взаимодействия глобулярных белков высока и составляет в среднем 0.7 (Jones and Thornton 1996), верхняя оценка размера условного сайта бинарного взаимодействия в сигнальном комплексе соответствует кругу диаметром ~30 Å. Альфа- или 3₁₀-спирали такой протяжённости соответствовали бы пептиду, состоящему соответственно из 20 или 15 аминокислот, тогда как пептид такой же длины в конформации, соответствующей тяжам β-листа, состоял бы из 8–9 аминокислот (Финкельштейн и Птицын, 2005). Следует отметить, что эти упрощённые оценки достаточно точно описывают диапазон размеров мишень-связывающего сегмента экспериментально подтверждённых блокирующих пептидов (Toshchakov and Vogel, 2007; Toshchakov and Javmen, 2020).

Наиболее часто используемыми векторами для переноса БП внутрь клеток являются пептидные векторы. Основание для использования пептидных векторов для транспорта макромолекул через плазматическую мембрану клеток была заложена во второй половине 80-х годов прошлого века открытием естественной способности Трансактиватора транскрипции (Tat), белка, кодируемого вирусом иммунодефицита человека, проникать через плазматические мембраны (Frankel and Pabo 1988; Green and Loewenstein 1988). Вслед за этим открытием аналогичная способность проникать через клеточные мембраны была обнаружена у белка мушек дрозофил *Antennapedia homeodomain* (Antp) (Joliot et al. 1991). Вскоре было

показано, что проникающая способность Antp обеспечивается за счёт присутствия относительно короткого, 16-ти аминокислотного сегмента первичной последовательности, формирующего третью α -спираль этого белка (Derossi et al. 1994). Позднее, функционально аналогичные, короткие последовательности (называемые проникающими пептидами (ПП)) были обнаружены в Tat и других белках, способных проникать через клеточные мембраны (Park et al. 2000, 2002; Joliot and Prochiantz 2004; Low et al. 2007). В настоящее время насчитывают более 1000 известных ПП различных классов (Kauffman et al. 2015; Kardani and Bolhassani 2021). Помимо ПП, обнаруженных в природных белках, известны и искусственно созданные ПП (Park et al. 2000; Joliot and Prochiantz 2004; Milletti 2012). На основании различий в физико-химических свойствах выделяют следующие классы проникающих пептидов: катионные, гидрофобные, а также амфипатические, включающие в себя как катионные, так и гидрофобные участки (Milletti 2012). Примерами катионных пептидов являются проникающие последовательности белков Tat (-RKKRRQRRR-), Antp (-RQIKIWFQNRRMKWKK-), а также других способных к интернализации транскрипционных факторов, содержащих гомеодомен (Joliot & Prochiantz, 2004; Prochiantz & Di Nardo, 2022). К этой же группе относятся и некоторые искусственные последовательности, такие как олигоаргинины или олиголизины (Milletti, 2012; Mitchell et al., 2000). Примером амфипатического ПП является транспортан, искусственно созданная комбинация двух фрагментов природных белков (Pooga et al., 1998). Гидрофобные ПП используются реже, и было отмечено, что они менее чувствительны к аминокислотным заменам (Milletti, 2012). Отмечалась меньшая эффективность гидрофобных ПП по сравнению с ПП других классов.

Механизмы интернализации ПП остаются предметом дискуссий в литературе (Joliot & Prochiantz, 2004; Sun et al., 2023). Общепризнанным является то, что ПП интернализируются посредством как эндоцитоза с

последующим выходом из эндосом, так и прямого взаимодействия с плазматической мембраной, причём отдельные ПП могут использовать множественные механизмы проникновения, важность отдельных из которых различается как для индивидуальных пептидов, так и для клеточных линий (Alves et al., 2011). Вместе с тем, ПП не используют специальных белковых переносчиков для проникновения в клетку, чем объясняется универсальность их действия в отношении клеток различных типов. Длина использовавшихся ПП варьирует в диапазоне 5–30 аминокислотных остатков. Помимо белков и пептидов, ПП способны переносить внутрь клеток макромолекулярные соединения различной природы, включая нуклеиновые кислоты, медицинские препараты и контрастные вещества, а также сложные мультимолекулярные структуры, такие как липосомы или наночастицы (Bechara & Sagan, 2013; Milletti, 2012; Sun et al., 2023). Пептидные векторы эффективны для внутриклеточного транспорта различных веществ не только в монослое культивируемых клеток. Многочисленные исследования показывают, что ПП также повышают тканевую проницаемость, включая проницаемость через гематоэнцефалический барьер. Так, уже в ранней работе было показано, что Tat пептид обеспечивает проникновение введённой интраперитонеально β -галактозидазы, белка размером 120 kD, во все ткани мышей, включая мозг (Schwarze et al., 1999). Результаты последующих работ подтвердили эффективность ПП для внутриклеточного транспорта карго различной природы *in vivo*, а также показали широкое распределение по органам как при интраперитонеальном, так и при внутривенном введении (Nakase et al., 2012; Piao et al., 2013; Reveret et al., 2023; Sarko et al., 2010). Вместе с тем отмечалось преимущественное накопление ПП в печени и почках, тогда как накопление в мозгу и мышцах было существенно меньше (Nakase et al., 2012; Sarko et al., 2010).

Отметим, что типичные рабочие концентрации ПП при применении в культуре клеток находятся в достаточно узком диапазоне, варьируя от 1–5

μM до 50–100 μM, для широкого спектра ПП, транспортируемых агентов, а также клеточных линий (Toshchakov & Javmen, 2020). Наиболее вероятной причиной существования узкого нижнего предела пептидных концентраций, способных подавлять широкий спектр функции, является низкая эффективность их транспорта внутрь клеток при меньших концентрациях ПП. Существование верхнего предела используемых на клетках концентраций ПП обусловлено цитотоксичностью, зачастую наблюдаемой при использовании БП в концентрациях, превышающих 100 μM, что связано с их мембранотропным действием и способностью формировать мембранные поры при высоких концентрациях.

Другим проявлением мембранотропных свойств ПП являются антимикробные свойства, основывающиеся на сходстве их физико-химических свойств со свойствами так называемых «антимикробных пептидов» (Dutta & Das, 2016; Henriques et al., 2006). Антимикробными пептидами (АМП) называют природные пептиды, кодируемые в геномах как растений, так и животных, как элемент системы противомикробной защиты, эффективный против патогенов различных классов, включая бактерии, вирусы и грибы. Оба класса пептидов, как ПП, так и АМП, в основном представлены катионными пептидами, включающими в себя значительную долю гидрофобных аминокислотных остатков. И хотя механизмы бактерицидного действия АМП вероятно множественны, как ПП, так и АМП проявляют меньшую цитотоксичность в отношении животных клеток по сравнению с активностью в отношении прокариот.

Несмотря на огромный прогресс в открытии новых ПП, наиболее часто используемыми векторами остаются 2 ПП, открытые первыми: Tat пептид и вектор из *Antennapedia homeodomain*, часто называемый в литературе пенетратин. Следует отметить, что относительная эффективность этих векторов варьирует в различных системах и зависит от клеточной модели и природы молекулярной мишени — в одних системах Tat оказывается более эффективным, в других более эффективен пенетратин. С одной

стороны, эффективность переноса зависит от таких свойств пептида-вектора как суммарный заряд и наличие триптофанов в его последовательности (Bechara et al., 2013). Другим важным фактором является спектр глюкозаминогликанов и фосфолипидов, присутствующих в плазматической мембране клетки-мишени (Alves et al., 2011; He et al., 2025). Однако, несмотря на существенный прогресс в понимании механизмов проникновения, первичный выбор ПП для использования в той или иной конкретной модели продолжает осуществляться исследователями эмпирически, на основе экспериментальной проверки. Одним из удобств использования пенетратина является простота определения его количественного содержания. Пенетратин содержит аминокислотные остатки триптофана, соответственно его концентрацию можно определять спектрофотометрически, тогда как такая возможность для БП, содержащих Tat, зависит от присутствия поглощающих ароматических аминокислотных остатков в блокирующей части пептида. Следует отметить, что природные последовательности, обеспечивающие проникновение белков в клетку, в высокой степени эволюционно сохранны. Так, проникающая последовательность белка дрозофилы Antp на 100% сохранна в нескольких гомеодомен-содержащих белках человека. Высокая степень эволюционной сохранности проникающих последовательностей отражает их биологическую значимость для функции белков-носителей.

В заключение обзора литературы следует отметить, что TIR домены чрезвычайно широко распространены в природе и обнаруживаются во всех доменах биоты. Функция TIR доменов двойственна. Многие бактериальные и растительные TIR домены, а также белок животных SARM1, способны катаболизировать НАД. TIR домены, не обладающие каталитической активностью, функционируют в качестве доменов взаимодействия белков, осуществляя регулируемое связывание белков посредством образования олигомерных «сигнальных комплексов», играя таким образом ключевую роль в регуляции биологических процессов.

Способность TIR доменов формировать стабильные олигомерные структуры сигнал-зависимым способом определяется присутствием множественных сайтов связывания, каждый из которых способен осуществлять слабое (обратимое) бинарное TIR-TIR взаимодействие. Стабильность сигнальных комплексов достигается за счёт кооперативности бинарных взаимодействий, обусловленной специфическим расположением и ориентацией сайтов связывания на поверхности домена, допускающими возможность одновременного установления множественных TIR-TIR взаимодействий (Рис. 3). TIR домены содержатся в белках млекопитающих, играющих ключевую роль в индукции и регуляции иммунного ответа на инфекционные агенты: в Толл-подобных рецепторах, в белках семейства рецептора интерлейкина-1, а также в адаптерных белках, рекрутируемых при активации TIR-содержащих рецепторов. Выявление принципов функционирования TIR доменов в качестве доменов взаимодействия имеет важное значение для понимания базовых механизмов регуляции биологических процессов, а также организации сигнальных путей. Разработка методов, позволяющих направленно регулировать специфические взаимодействия TIR доменов, может иметь важное народнохозяйственное значение с возможным применением в растениеводстве, животноводстве и медицине.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 Культивирование клеток

В исследованиях использовались первичные культуры макрофагов мышей, а также стабильные линии клеток человека (HEK293T, HeLa, Jurkat, THP-1 и U87) и мышей (L929 и RAW264.7). Исходный материал для поддержания указанных клеточных линий был получен в репозитории биоматериалов ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA).

3.1.1 Получение и поддержание первичной культуры перитонеальных макрофагов

Для получения первичной культуры перитонеальных макрофагов использовались мыши линий C57Bl/6J, C3H/OuJ, а также дочерней по отношению к C3H/OuJ линии C3H/HeJ, характеризующейся мутацией гена *Tlr4* (Poltorak et al., 1998). Указанные линии мышей получали в Лаборатории Джексона (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA). Использовали стандартный протокол получения перитонеальных макрофагов (Layoun et al., 2015) с незначительными модификациями. Миграцию макрофагов в брюшную полость мышей вызывали интраперитонеальным введением стерильной 3% тиогликолатной среды (Remel). Тиогликолатную среду вводили ip однократно в объёме 3 мл. На 4-й день после введения тиогликолата мышей эвтаназировали и проводили перитонеальный лаваж посредством трёхкратной промывки брюшной полости ледяным фосфатно-солевым буфером (4–5 мл буфера на каждую промывку). Полученные клетки отмывали однократным центрифугированием и сеяли в 6-ти, 12-ти, или 96-ти луночные планшеты (2×10^6 , 1×10^6 и $0,7\text{--}1 \times 10^5$ клеток на лунку, соответственно). Клетки инкубировали 16–24 часа в среде RPMI 1640, содержащей 2% телячьей сыворотки, 1% пенициллин/стрептомицина и 2 мМ L-глутамина. Инкубацию проводили при 37°C в атмосфере,

содержащей 5% CO₂. По окончании инкубации не прикрепившиеся клетки удаляли однократной промывкой лунок согретым фосфатно-солевым буфером, а прикрепившиеся клетки использовали в экспериментах.

3.1.2 Получение и культивирование макрофагов костного мозга

Первичные культуры макрофагов костного мозга (КММ) получали согласно модифицированной методике Weischenfeldt и Porse (Javmen et al., 2018; Weischenfeldt & Porse, 2008). При этом бедренные и большеберцовые кости мышей линии C57Bl/6J промывались ледяным фосфатно-солевым буфером. Полученные клетки переносились в среду RPMI 1640, дополненную супернатантом клеток L929 (10%), и культивировались в течение 10–14 дней с однократной сменой среды, после чего полученные макрофаги использовались в экспериментах. Функциональность полученной культуры оценивали по интенсивности ответа клеток на агонисты TLR.

3.1.3 Культивирование клеточных линий

Клетки линий HEK293T, HeLa, THP-1, RAW264.7 и Jurkat культивировали в среде DMEM, дополненной 10% телячьей сывороткой. Перед использованием в экспериментах клетки THP-1 дифференцировали трёхдневной инкубацией в присутствии 10 нМ форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA).

Для получения супернатантов, обогащённых колониестимулирующим фактором макрофагов, клетки L929 наращивали в стандартных условиях культивирования до ~80% конфлюентности, после чего среду культивирования сменяли на свежую, инкубировали клетки еще 4–6 дней и собирали среду. Собранную кондиционированную среду центрифугировали, полученный супернатант фильтровали через

стерилизующий фильтр и использовали для дифференциации костномозговых макрофагов.

3.2 Аналитические методы оценки функционирования сигнальных путей

3.2.1 Методы оценки функции Толл-подобных рецепторов в культуре клеток

Способность TLR воспринимать и передавать сигналы оценивалась по изменению уровней фосфорилирования и экспрессии внутриклеточных белков методом вестерн-блоттинга, по уровню экспрессии цитокиновой мРНК методами блоттинга по Саузерну или ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени, а также по продукции цитокинов после стимуляции клеток агонистами TLR.

3.2.1.1 Вестерн-блоттинг

Для получения белковых экстрактов клетки сеяли в 6-ти луночные планшеты. По выполнении обработки клеток согласно протоколам экспериментов, среду инкубирования удаляли, клетки промывали фосфатно-солевым буфером, дополненным 1 мМ ортованадата натрия, и лизировали в 0,25 мл лизирующего буфера, содержащего 20 мМ Tris, 50 мМ NaCl, 1.5 мМ MgCl₂, 2 мМ EDTA, 10 мМ NaF, 2 мМ DTT, 1 мМ Na₃VO₄, 1% Тритон X-100 и дополненного коктейлем ингибиторов протеаз Complete™ (Roche). Содержание белка в лизатах определяли методом Брэдфорда. Нормализованные по количеству белка аликвоты полученных лизатов смешивали с 4-х или 2-х кратным буфером по Laemmli и денатурировали в течение 5 минут на кипящей водяной бане. 20 мкл полученных лизатов разгоняли на 10% полиакриламидном геле, используя Трис-глициновый-SDS буфер (25 мМ Tris, 250 мМ glycine, 0,1% SDS), и электрофоретически переносили на поливинилиденфторидные мембраны (100 V, 1.5 часа, 4°C) (Mahmood & Yang, 2012; Toshchakov et al., 2005). Затем мембраны

блокировали в течение часа при комнатной температуре на роторном шейкере, используя 5% обезжиренный молочный порошок (Bio-Rad) или 5% бычий сывороточный альбумин, растворенные в буфере TBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20). После блокирования мембраны трижды промывали буфером TBS-T на роторном шейкере (5 минут каждая промывка) и инкубировали 15–20 часов в TBS-T с первичными антителами в разбавлении 1/1000. После инкубации мембраны промывались трижды по 5 минут в TBS-T, инкубировались со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, трижды промывались TBS-T и проявлялись, используя проявитель хемилюминисценции ECL+ от компании Amersham Pharmacia Biotech согласно протоколу производителя.

3.2.1.2 Оценка экспрессии цитокиновой мРНК

3.2.1.2.1 Выделение РНК методом фенол-хлороформной экстракции

Общая клеточная РНК выделялась методом фенол-хлороформной экстракции при помощи коммерчески производимых реагентов RNA Stat-60 или Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA). Клетки лизировались добавкой реагентов непосредственно в планшеты после удаления культуральной среды. Добавляли 0,5 мЛ реагента на лунку 12-луночного планшета. Планшеты с лизирующим агентом шейкировали на холоду в течение 10-15 минут и собирали лизаты пипетированием. Собранные лизаты переносились в эппендорфовские пробирки. Водная, РНК-содержащая фракция получалась добавлением 100 мкЛ хлороформа к лизатам, с последующим тщательным перемешиванием и центрифугированием в течение 15 минут при 12000 g. Затем 200 мкЛ образовавшейся водной фракции переносилось в отдельные охлажденные пробирки, содержащие 0,25 мЛ изопропилового спирта. После инкубации на холоду РНК осаждалась центрифугированием при 12000 g в течение 10 минут.

Супернатант удалялся, а осадок ресуспендировался в 0,75–1 мл 75% этилового спирта и повторно центрифугировался. Для полного удаления изопропанола промывку 75% этиловым спиртом выполняли дважды. После второй отмывки этанол удалялся вакуумным отсосом, и осадок высушивался на воздухе в течение 5–10 минут, не допуская пересушивания. Полученный осадок растворялся в 25–30 мкл воды “Milli-Q” свободной от РНКаз. Для полного растворения преципитата РНК, закрытые пробирки инкубировались в течение 10 мин при 65° С. Содержание РНК в пробах определялось спектрофотометрически при помощи прибора NanoDrop.

3.2.1.2.2 Синтез первичной цепи кДНК

Обратную транскрипцию РНК выполняли при помощи коммерческих наборов Promega, использующих обратную транскриптазу вируса миелобластома птиц, или наборов RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Fermentas), использующих рекомбинантный вариант обратной транскриптазы вируса мышинного лейкоза Молони. Транскрибировали 1 мкг РНК согласно протоколам, предлагаемым производителями реактивов. После проведения реакции обратной транскрипции полученную кДНК разводили до концентрации 5 нг/мкл и хранили при -20°С до выполнения ПЦР.

3.2.1.2.3 Определение количества кДНК методом блоттинга по Саузерну

Применявшийся в наших ранних исследованиях метод определения экспрессии цитокиновой мРНК по Саузерну был описан ранее (Barber et al., 1995; Toshchakov et al., 2002) и состоял из следующих основных этапов. На первом этапе из культивируемых макрофагов, обработанных стимуляторами или ингибиторами экспрессии цитокинов согласно экспериментальному протоколу, выделяли общую мРНК описанным выше

методом фенол-хлороформной экстракции. Полученную мРНК транскрибировали, используя обратную транскриптазу вируса лейкемии мышей (MMLV) согласно протоколу производителя фермента (Promega, USA). Полученную кДНК амплифицировали, используя ген-специфические праймеры. При проведении ПЦР количество циклов амплификации продуктов отдельных генов варьировали, используя для амплификации IL-1 β 35 циклов, TNF 31 цикл, IL-6 30 циклов, IFN- γ 35 циклов, IL-12 p35 31 цикл, IL-12 p40 22 цикла, MIP-1 α 27 циклов, MIP-2 26 циклов, IP-10 30 циклов, JE 32 цикла, MCP-5 29 циклов. Референсный ген гипоксантин-гуанин фосфорибозил трансферазу (HPRT) амплифицировали в 24 циклах. Полученные продукты амплификации разгоняли на агарозном геле, переносили на нейлоновые мембраны Nytran методом Southern блоттинга в течение 16–18 часов и подвергали перекрёстному сшиванию посредством ультрафиолетового облучения. Затем мембраны инкубировали при 80° Цельсия в течение 2-х часов и гибридизировали с ген-специфическими олигонуклеотидными пробами. Количество продуктов амплификации оценивали хемилюминисцентным методом, используя систему усиленной хемилюминесценции (ECL) фирмы Amersham согласно протоколу производителя.

3.2.1.2.4 Определение количества кДНК методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени

В большинстве исследований экспрессию генов оценивали методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Использовали амплификационную смесь SYBR Green PCR Master Mix и амплификатор ABI Prism 7900HT производства компании Applied Biosystems (США). Амплифицировали 5–10 нг исходной кДНК. Дизайн ген-специфических праймеров осуществляли с помощью программы Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) или других аналогичных программ.

3.2.1.3 Анализ секретиции цитокинов методами иммуноферментного анализа (ИФА)

Секрецию цитокинов (за исключением IL-1 β) оценивали по их содержанию в супернатантах клеток, стимулированных агонистами TLR согласно условиям эксперимента. Продукцию IL-1 β оценивали по его содержанию в лизатах клеток, стимулированных агонистами TLR согласно экспериментальному протоколу. Лизаты получали как описано выше для блоттинга по Вестерну, но первичные лизаты не смешивали с буфером по Лэммли и исключали этап денатурации белков. Собранные супернатанты и лизаты хранили при -80°C до проведения измерения содержания цитокинов. В большинстве экспериментов использовали коммерческие ИФА наборы производства компании Biolegend (USA), однако в некоторых случаях использовали и наборы других производителей. Измерения производили согласно протоколам, рекомендуемым производителями наборов ИФА, используя планшетный спектрофотометр LT-4000 (Китай).

3.2.2 Оценка влияния пептидов на жизнеспособность клеток

Жизнеспособность клеток оценивали колориметрически с помощью МТТ теста. Для оценки влияния пептидов на жизнеспособность клеток свежеизолированные перитонеальные макрофаги мышей сеяли в 96-ти луночные планшеты (0,7–1 x 10⁵ клеток на лунку) как описано выше в разделе 3.1.1. Затем неприкрепившиеся клетки удаляли, меняя культуральную среду на свежую, пептид-содержащую или контрольную среду, а прикрепившиеся клетки инкубировали в присутствии различных концентраций пептидов согласно целям эксперимента. По выполнении экспериментальных условий оценки пептидов, добавляли МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) в конечной концентрации 1,67 мМ и инкубировали ещё 3 часа. По окончании инкубации в присутствии МТТ, культуральные среды аспирировали, и клетки лизировали в 50 мкл изопропанола, содержащего 0.1% Nonidet P-40 и 4 мМ

соляную кислоту, шейкуруя в течение 15 минут. По окончании лизиса измеряли оптическую плотность на планшетном спектрофотометре при длине волны 570 нм. Для получения негативного контроля на жизнеспособность клетки обрабатывали детергентом Triton X-100 (0.1%) или индуцировали апоптоз 20-часовой инкубацией клеток в присутствии TNF (10 нг/мл) и актиномицина D (1 мкг/мл).

3.2.3 Источники антител, использовавшихся в экспериментальной работе

Все антитела, использовавшиеся с аналитическими целями, были получены из коммерческих источников от известных производителей антител. Моноклональные мышинные антитела к метке FLAG (клон M2, каталожный номер F3165) были получены от Sigma-Aldrich. В экспериментах с иммунопреципитацией использовали моноклональные мышинные антитела к CFP (клон 8A6) от Origene. Антитела к последовательности пенетратина (использовались при выполнении дот-блоттинга) были от Abcam. Содержание активированных форм сигнальных белков определяли с помощью следующих кроличьих антител, полученных от Cell Signaling Technologies: Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Antibody (#9211), Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody (#9251), Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody (#9101), Phospho-Stat1 (Tyr701) (58D6) Rabbit Monoclonal Antibody (#9167) и Phospho-IKK α/β (Ser180/181). В ранних исследованиях также использовали антитела от фирмы Zymed к STAT1, фосфорилированному по сайту Y701, а фосфо-ERK определяли антителами от Promega. Для определения суммарного содержания фосфорилированных и не фосфорилированных форм сигнальных белков использовали антитела к STAT1 (#9172), JNK (#9252) и ERK (#9102) от Cell Signaling Technologies. Для контроля загрузки белка при выполнении Вестерн-блоттинга также использовали антитела к β -актину от

Santa Cruz Biotechnology и к GAPDH от Cell Signaling Technologies. IRF-1 определяли антителами от Santa Cruz Biotechnology (sc-640).

3.3 Методы идентификации белков-мишеней, связываемых ингибиторными пептидами

В работе использовали два подхода к идентификации TIR доменов, связываемых ингибиторными пептидами. Первый метод выполнялся *in vitro* и предусматривал получение лизатов клеток, экспрессирующих тот или иной TIR домен, меченый преципитационной меткой. Полученные лизаты инкубировались с ингибирующими пептидами согласно целям эксперимента, и TIR домены преципитировались антителами к преципитационной метке. Содержание пептидов в преципитатах определялось методом дот-блоттинга. Во втором методе TIR-пептидное связывание оценивалось непосредственно в клетках спектрофотометрически по Фёрстеровскому резонансному переносу энергии (FRET), наблюдаемому при прямом взаимодействии ингибирующего БП с TIR доменом-мишенью.

3.3.1 Дот-блоттинг

Плазмиды, кодирующие TIR домены, являющиеся потенциальными мишенями ингибиторных пептидов, трансфицировали в клетки линии HeLa или HEK293T с помощью Липофектамина или других аналогичных коммерчески доступных трансфицирующих агентов согласно рекомендациям производителей. Трансфицированные клетки поддерживали в культуре в течение 24-48 часов и лизировали. Аликвоты полученных лизатов, содержащие 100 мкг общего белка, разбавляли PBS до 0,5 мл и инкубировали в присутствии 20 мкМ различных пептидов в течении часа при 4°C. Затем добавляли антитела, специфичные к белковой метке, присутствующей в трансфицированном белке (например, анти-FLAG или анти-Cer 8A6 антитела от Origene), и инкубировали 3–4 часа. Затем

комплексы антиген-антитело иммобилизовали агарозой, конъюгированной с белком G (25 мкг) (Roche), и отмывали PBS 3-х кратным центрифугированием. Отмытый осадок денатурировали кипячением в буфере Laemmli в течение 5 минут. Полученный экстракт центрифугировали, супернатант наносили на PVDF мембрану и анализировали с помощью моноклональных антител, специфичных к проникающей последовательности Antr, присутствующей во всех тестируемых пептидах (Abscam).

3.3.2 Оценка пептид-белкового связывания методами спектроскопии флуоресценции *in situ*

В дополнение к методам иммунопреципитации использовались спектрофотометрические методы изучения белок-пептидного связывания с использованием FRET системы. Преимуществами спектрофотометрических методов в сравнении с иммунопреципитацией является исключение не прямых взаимодействий мишени с лигандом, возможность изучения взаимодействия непосредственно в клетке, в условиях сохранения естественной компартментализации микроокружения, а также избежание технических проблем, связанных с подбором антител, которые бы не влияли на изучаемое взаимодействие.

3.3.2.1 FRET-система для оценки TIR-пептидного связывания в клетках

Используемая FRET-система состояла из экспрессируемого в эукариотической клетке TIR домена, сопряженного с флуоресцентным белком, и пептида, меченого органическим красителем, способным поглощать флуоресценцию белковой метки (Piao et al., 2015; Toshchakov et al., 2011). Донором флуоресценции в использовавшейся FRET-системе служил белок Cerulean (Cer), связанный с C-концом изучаемого TIR домена двуаминокислотным линкером –Ser-Gly–. Cer является модификацией

Голубого флуоресцентного белка, в свою очередь являющегося производным Зелёного флуоресцентного белка медузы *Aequorea victoria* (Rizzo et al., 2004). Cer отличается от своего прототипа более высоким квантовым выходом флуоресценции, фотостабильностью и однокомпонентным профилем затухания флуоресценции (Rizzo et al., 2004). В качестве акцептора флуоресценции использовали флуоресцентные красители Bodipy-TMR-X или Cy3 конъюгированные с N-концом исследуемых пептидов. Указанием на прямое связывание в паре БП-TIR служило тушение флуоресценции экспрессируемой в клетках конструкции TIR-Cer в присутствии исследуемого флуоресцентно-меченого БП.

Использовали следующую экспериментальную схему подготовки слайдов для оценки TIR-пептидного связывания: в первый день эксперимента клетки линии HeLa трансфицировали панелью плазмид, кодирующих флуоресцентно меченые TIR домены, являющиеся потенциальными мишенями изучаемых пептидов. На следующий день после трансфекции клетки снимали трипсинизацией и пересевали на предметные стёкла с монтированными на них 50-ти луночными тефлоновыми установочными прокладками (CultureWell™ mounting gaskets) производства компании Grace Bio-Labs (США). Сеяли 7000–8000 клеток на лунку. На третий день эксперимента (второй после трансфекции) клетки инкубировали 1 час в среде, содержащей флуоресцентно меченые БП. Затем среду удаляли, снимали установочные прокладки, клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида, и монтировали слайды для последующего анализа флуоресценции белковой метки.

3.3.2.2 Детекция TIR-пептидного связывания в клетках посредством спектроскопии флуоресценции с временным разрешением

Детекцию связывания блокирующих пептидов с TIR доменами осуществляли с использованием описанной выше FRET системы. Наличие

FRET определяли по сокращению времени жизни флуоресценции донора. На раннем этапе исследований время жизни флуоресценции Cer определяли при помощи флуориметра с временным разрешением K2 производства компании ISS (Champaigns, USA), соединённым с флуоресцентным микроскопом (Axiovert TV130, Zeiss). В этой конфигурации инструментов измеряется интегральный флуоресцентный сигнал от клетки или группы клеток (Toshchakov et al., 2011). Время жизни флуоресценции донора определяли путём сбора данных по фазовому сдвигу и модуляции интенсивности флуоресценции при варьировании частоты модуляции возбуждения в диапазоне 5–300 МГц. Флуоресценцию донора возбуждали голубым фотодиодом с использованием полосного светофильтра 426–446 нм и детектировали через эмиссионный светофильтр 480/40 нм. Эффективность FRET (E) рассчитывали по формуле:

$$E = 1 - \frac{\langle T_{da} \rangle}{\langle T_d \rangle}$$

где $\langle T_{da} \rangle$ и $\langle T_d \rangle$ средние времена жизни флуоресценции донора в присутствии акцептора и без него, соответственно.

В более поздних исследованиях для детекции FRET использовали микроскопию времени жизни флуоресценции (FLIM) — подход, позволяющий анализировать флуоресцентные сигналы биологических объектов попиксельно и генерировать изображения изучаемых объектов. Использовали FLIM систему Alba 5 производства компании ISS (США) с пакетом программного обеспечения VistaVision Suite v. 204 той же компании. Флуоресценцию белка Cer возбуждали лазерным диодом 443 нм, сопряжённым со сканирующим модулем и микроскопом Olympus IX71S через мультиполосный интерференционный фильтр 443/532/635 нм (Semrock, США). Эмиссию наблюдали через полосовой фильтр 480/30 нм и детектировали на фотоумножителе H7422-40 (Hamamatsu Photonics). FLIM система Alba 5 позволяет получать данные как в частотном (fdFLIM),

так и во временном домене (tdFLIM). При проведении fdFLIM использовали ISS A320 FastFLIM модуль. Для калибровки прибора в качестве стандарта однокомпонентного затухания флуоресценции со временем жизни 4,0 нс использовали флуоресцеин в буфере с pH 8,0.

tdFLIM проводили с использованием устройства для подсчёта одиночных фотонов со сверхвысоким временным разрешением TCSPC Model SPC-830 (Becker & Hickl). Сканировали изображения размером 256 x 256 пикселей с разрешением ~0,4–0,7 мкм/пикс и скоростью сканирования 1000 пикс/с. В зависимости от интенсивности флуоресценции образца аккумулировали сигналы, полученные в 2–5 повторных сканированиях. Анализ кривых затухания флуоресценции и определение времени затухания флуоресценции проводили при помощи пакета программного обеспечения VistaVision Suite v.204 (ISS, США).

Кривые затухания флуоресценции аппроксимировали, используя модель двух- или (при необходимости коррекции на автофлуоресценцию клеток) трёхкомпонентного экспоненциального затухания (Szmecinski et al., 2014), и анализировали согласно формулам:

$$\tau_{\alpha} = \sum \alpha_i \tau_i$$

$$\sum \alpha_i \tau_i = 1$$

где τ_{α} — среднее (взвешенное по амплитуде) время затухания флуоресценции, α_i — амплитуда i -го компонента, τ_i — время жизни i -го компонента;

$$E = 1 - \tau_{DA} / \tau_D,$$

где E — эффективность FRET, τ_{DA} — среднее время затухания флуоресценции донора в присутствии акцептора, τ_D — среднее время затухания флуоресценции донора в отсутствие акцептора.

Характер и характеристические времена жизни флуоресценции компонентов устанавливали в предварительных экспериментах методом фазорных диаграмм, как описано в литературе (Digman et al., 2008; Lakowicz, 2006; Malacrida et al., 2025; Szmanski et al., 2014). Используемые характеристические времена жизни флуоресценции долго- и короткоживущего компонента для двухкомпонентной системы составляли 2,80–2,95 и 0,6–0,95 нс, соответственно. Флуоресценцию долгоживущего компонента интерпретировали как вклад свободного, не связанного с акцептором донора. Флуоресценцию короткоживущего компонента интерпретировали как флуоресценцию донора, связанного с акцептором. Соответственно, использовали уравнения:

$$\alpha_1 = [DA]/([D]+[DA])$$

и

$$\alpha_2 = [D]/([D]+[DA]),$$

где $[DA]$ и $[D]$ — локальные концентрации связанного с акцептором и свободного донора, соответственно, а α_1 и α_2 — фракционные амплитуды коротко- и долгоживущего компонента, соответственно.

3.3.3 Характеристика TIR-пептидного связывания с использованием рекомбинантного TIR домена методами анизотропии флуоресценции и поверхностного плазмонного резонанса

Метод анизотропии флуоресценции (АФ) использовали для изучения связывания пептида 2R9 с TIR доменом адаптерного белка TIRAP. Метод АФ основывается на увеличении анизотропии флуоресценции лиганда при связывании с белком-мишенью вследствие уменьшения ротационной подвижности связанного с мишенью лиганда. В качестве флуоресцентно меченого лиганда использовали ингибиторный пептид 2R9 с присоединённой к N-концу пептида флуоресцентной меткой Bodipy-TMR-X (пептид BTX-2R9). В качестве контроля специфичности связывания использовали пептид 2R1, также меченный BTX (пептид BTX-2R1).

Анизотропию флуоресценции BTX-2R1 измеряли в отсутствие и в присутствии 100 нМ рекомбинантного TIR домена TIRAP. Для проведения анализа связывания пептида BTX-2R9 с белковыми мишенями, BTX-2R9, растворённый в PBS в концентрации 50 нМ, титровали рекомбинантным TIR доменом адаптера TIRAP или бычьим сывороточным альбумином (BSA). Титрование BSA служило в качестве контроля на специфичность связывания пептида с белковой мишенью. Связывание пептида белком детектировали по возрастанию анизотропии флуоресценции BTX при увеличении концентрации белка. Аппроксимацию данных титрования проводили логистической функцией, при этом предельное значение АФ в присутствии насыщающих концентраций белковой мишени оценивали исходя из размеров белков-мишеней.

При изучении кинетики связывания пептида 2R9 с TIR доменом адаптерного белка TIRAP методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на поверхности проточной ячейки иммобилизировался пептид 2R9. В контрольной ячейке иммобилизировался пептид *Antp*, который не содержал TIR-связывающего сегмента, но включал в себя проникающий вектор (Табл. 1). Сенсограммы получали пассивированием рекомбинантного TIR домена мышинового TIRAP через ячейки в концентрациях 21, 43, 86, 178, and 344 мкМ. В качестве восстанавливающего агента, разрушающего TIR-пептидное связывание, использовался β -меркаптоэтанол (BME).

3.4 Оценка системного влияния блокирующих пептидов на TLR в моделях *in vivo*

В экспериментах использовали мышей линии C57BL/6J возрастом 7–10 недель, содержащихся в стандартных условиях вивария. Агонисты TLR вводились животным интраперитонеально. Дозы, использовавшиеся в конкретных экспериментах, указаны в разделе Результаты на графиках или в тексте, представляющем результаты экспериментов. Пептиды, вводились мышам как интраперитонеально, так и в хвостовую вену. При

интраперитонеальном введении стандартная доза БП составляла 10 нмоль/г веса, которая вводилась в виде 400 мкМ раствора пептида в PBS. Концентрацию пептидов в стоковых растворах проверяли спектрофотометрически, используя коэффициенты экстинкции, рассчитанные по методике Pace et al. (Pace et al., 1995).

При оценке способности пептидов предотвращать гибель животных, индуцированную «цитокиновым штормом» при системной активации TLR, мышам вводили высокоочищенный *E. coli* LPS в дозе 17,5 мкг/г, что вызывало 100% летальность в контрольной группе. При оценке эффективности пептидов, ингибирующих TLR, системная активация которых сама по себе не смертельна (TLR2 или TLR9), мыши сенсibilizировались к введению агонистов TLR i.p. инъекцией D-галактозамина (D-gal) в дозе 20 мкг за 90 минут до введения агонистов TLR2 или TLR9.

3.5 Оценка способности блокирующих пептидов модулировать ответ на вирусный патоген

Оценивался пептид 2R9 в двух типах экспериментов. В первой серии экспериментов изучали влияние 2R9 на продукцию цитокинов в первичной культуре перитонеальных мышинных макрофагов, инфицированных адаптированным к мышам штаммом вируса гриппа H1N1 A/PR/8/34 (PR8). Во второй серии изучали влияние пептида на смертность мышей, инфицированных PR8. Вирус PR8 был изначально получен в ATCC (American Tissue Culture Collection) и наращивался в аллантоисной жидкости 10-ти дневных куриных эмбрионов (Shirey et al., 2013).

В первой серии экспериментов вирусом заражали первичную культуру перитонеальных макрофагов, полученных от мышей линии C57BL/6J как с нокаутированным геном *MyD88*, так и без нокаута. Культуры макрофагов инкубировали в присутствии вируса в дозе 1 MOI в течение двух часов. По истечении инкубации с вирусом, культуру промывали PBS, и добавляли

свежую среду RPMI, содержащую 2% телячьей сыворотки, без добавления пептида, или же содержащую контрольный пептид или пептид 2R9 в концентрации 20 или 40 мкМ. Отбор проб супернатанта для определения содержания цитокинов производили через 24 часа после инфицирования клеток.

Во второй серии мыши получали интраназальный инокулят вируса в дозе, вызывающей ~90% смертность в контрольной группе (~7,500 TCID₅₀). Пептид 2R9 или контрольный пептид растворяли в PBS и вводили мышам ежедневно в виде однократной ip инъекции в дозе (200 нмоль), начиная со второго дня после инокуляции вируса. В одной из контрольных серий использовали конкурентный ингибитор TLR4 липидной природы Эриторан (E5564) (Eisai, Japan) в дозе (200 мкг). E5564 вводили мышам iv. Статистическую достоверность различий в выживаемости между экспериментальными группами оценивали по тесту Мантеля-Кокса с помощью программы Prism 5.

3.6 Биоинформатический анализ эволюционной изменчивости аминокислотных последовательностей TIR доменов

Анализ эволюционной изменчивости последовательностей TIR доменов проводился с целью идентификации функционально значимых мотивов последовательностей, выявляемых как участки, проявляющие меньшую межвидовую вариабельность.

3.6.1 Идентификация TIR доменов в базах данных белковых последовательностей и построение выравнивания последовательностей известных TIR доменов

Идентификация TIR доменов производилась с помощью пакета программ MAPGAPS (Neuwald, 2009). Поиск проводился в курируемых NCBI базах данных уникальных белковых последовательностей (nr и env_nr), доступных по адресу <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/>. В качестве

запроса для поиска использовалось курированное выравнивание TIR доменов (smart00255), полученное из базы данных SMART (Letunic and Bork, 2018), к которому были вручную добавлены последовательности TIR доменов белков TRIF и TRAM. Из полученного пула последовательностей были удалены фрагменты (т.е. последовательности, соответствующие запросным последовательностям менее чем на 75%), также из анализируемого пула были удалены последовательности, совпадающие с представительной последовательностью более чем на 98%. В результате этой процедуры было выявлено 26414 уникальных последовательностей TIR доменов и построено их выравнивание.

3.6.2 Байесова классификация TIR доменов с выявлением мотивов последовательностей, характеризующих идентифицированные классы

Классификация TIR доменов строилась с помощью программного пакета BPPS, как детально описано ранее (Neuwald, 2014a, 2014b). BPPS иерархически классифицирует родственные белковые последовательности, основываясь на алгоритмически определяемых мотивах, которые наиболее отличают каждую из групп от других групп классификации. Группы полученной иерархии анализировались в сравнении с другими группами на основании имеющихся в литературе структурных и функциональных данных, характеризующих отдельных представителей группы (Toshchakov and Neuwald 2020).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Демонстрация специфичности взаимодействий TIR доменов

Изначальное понимание функционирования Толл-подобных рецепторов как семейства белков полагало, что отдельные члены семейства ответственны за распознавание микробных молекул различной природы, тем самым коллективно обеспечивая индукцию иммунного ответа на широкий спектр патогенов, тогда как эффекторные пути, активируемые различными TLR, эволюционно сохранены, и поэтому сходны и заключаются в активации факторов транскрипции семейства NF- κ B, а также MAP киназ (Medzhitov & Janeway, 2000). Наши исследования, выполненные в 2000–2002 годах, изменили эту парадигму. Так, исследование спектра цито- и хемокинов, продуцируемых макрофагами в ответ на стимуляцию агентами, специфически активирующими TLR2 и TLR4, выявило существенные различия (Hirschfeld et al., 2001), а последующее изучение механизмов, лежащих в основе этих различий, указало на раннюю продукцию IFN- β при активации TLR4 как на причину их возникновения (Toshchakov et al., 2002). Эти исследования в дальнейшем послужили основой для открытия MyD88-независимого, TRIF-зависимого сигнального пути, активируемого при стимуляции TLR3 и TLR4 (Oshiumi, Matsumoto, et al., 2003a; Oshiumi, Sasai, et al., 2003b; Yamamoto, Sato, Hemmi, Uematsu, et al., 2003a, 2003b; Yamamoto, Sato, Mori, et al., 2002a).

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

Исследования ответа макрофагов на стимуляцию LPS, полученным от грамотрицательных бактерий характеризующимися липидами A различной структуры, выявило как количественные, так и качественные отличия (Hirschfeld et al., 2001). Сравнивалась индукция цито- и хемокинов в ответ

на высокоочищенный LPS, полученный от *E. coli*, с ответами на препарат LPS, полученный от периодонтального патогена *Porphyromonas gingivalis*. Было сделано наблюдение, что LPS периодонтального патогена *Porphyromonas gingivalis* индуцирует меньшее число медиаторов воспаления (Рис. 6а) (Hirschfeld et al., 2001). В частности, отмечалось отсутствие индукции IFN- γ , а также хемокинов JE (MCP-1) и MCP-5 при использовании для стимуляции LPS периодонтального патогена *Porphyromonas gingivalis*, в то время как оба LPS активировали экспрессию IL-1 β и MIP-1 α приблизительно в равной степени (Рис. 6а). Другая подгруппа активируемых генов включала в себя TNF, MIP-2, IP-10 и IL-12p35 и отличалась сниженной продолжительностью экспрессии при стимуляции *Porphyromonas gingivalis* LPS (Рис. 6а).

С целью выяснения механизмов, отвечающих за дифференциальную индукцию цитокинов различными LPS, использовались макрофаги, полученные от мышей дефицитных по гену *Tlr4*, а также клетки U87, в норме не отвечающие на агонисты TLR, но трансфицированные плазмидами кодирующими *Tlr2* или *Tlr4*. Мыши линии C3H/HeJ характеризуются мутацией гена *Tlr4*, в следствие чего их клетки не способны отвечать на LPS грамотрицательных энтеробактерий (Poltorak et al., 1998). Перитонеальные макрофаги, полученные от мышей C3H/HeJ, использовались, чтобы выяснить вовлечённость TLR4 в индукцию цито- и хемокинов LPS *E. coli* и *Porphyromonas gingivalis*. Как и ожидалось, клетки, полученные от мышей C3H/HeJ, не отвечали на высокоочищенный *E. coli* LPS (Рис. 6б). Эти клетки, однако, сохраняли полный ответ на *Porphyromonas gingivalis* LPS (Рис. 6б). Аналогичный ответ наблюдался и в клеточной линии U87, трансфицированной плазмидой, запускающей экспрессию TLR2 — клетки отвечали на *Porphyromonas gingivalis* LPS, но не отвечали на стимуляцию LPS, полученным из культуры *E. coli* (Рис. 6в). Клетки U87, экспрессирующие TLR4, напротив, отвечали на *E. coli* LPS, но полностью утрачивали ответ на *Porphyromonas gingivalis* LPS (Рис. 6г). Эксперименты,

представленные на рисунке 6, показывают, что LPS, полученные от *E. coli* и *Porphyromonas gingivalis*, активируют иммунный ответ через различные TLR: высокоочищенный *E. coli* LPS активирует TLR4, тогда как *Porphyromonas gingivalis* LPS действует через TLR2. Этот факт, рассмотренный в сочетании с дифференциальной индукцией медиаторов воспаления этими препаратами LPS, в свою очередь, позволяет заключить, что сигнальные пути, активируемые различными TLR, отличны.

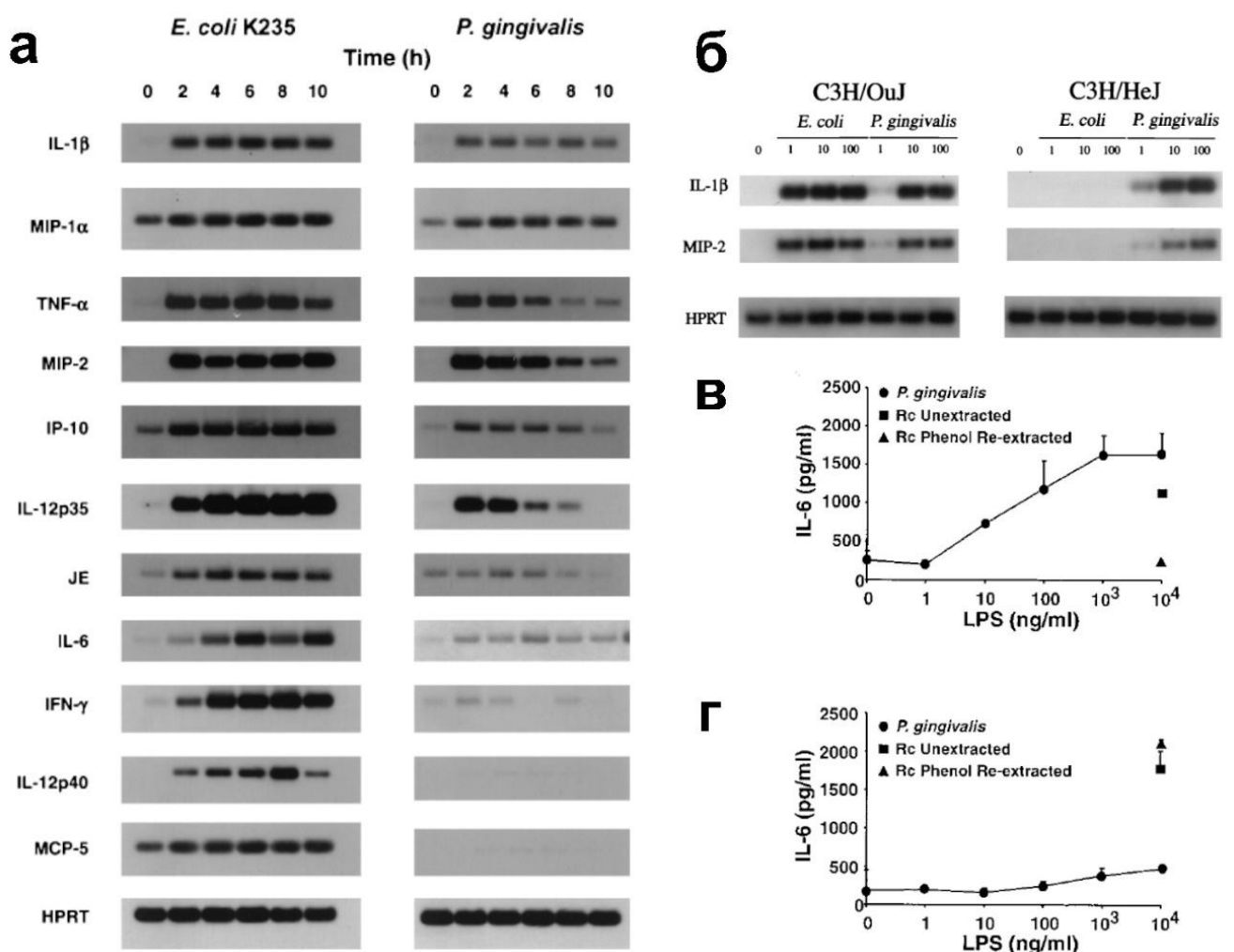


Рисунок 6 — Дифференциальная индукция цито- и хемокинов при стимуляции макрофагов бактериальными LPS различной природы (Hirschfeld et al., 2001)

а — высокоочищенный *E. coli* LPS K235 и LPS, полученный от *Porphyromonas gingivalis*, индуцируют перекрывающиеся, но не идентичные спектры хемо- и цитокинов.

Перитонеальные макрофаги мышей линии C3H/OuJ были стимулированы энтеробактериальным LPS K235 или LPS периодонтального патогена *Porphyromonas gingivalis* в дозе 100 нг/мл. Экспрессия медиаторов воспаления оценивалась методом ОТ-ПЦР в сочетании с блоттингом по Саузерну каждые 2 часа в течение 10 часов после стимуляции. Экспрессия *HPRT* оценивалась в качестве контроля.

б – перитонеальные макрофаги, полученные от линии мышей C3H/HeJ, являющейся дефицитной по гену *Tlr4*, утрачивают способность отвечать на высокоочищенный *E. coli* LPS K235, но отвечают в полной мере на LPS от *Porphyromonas gingivalis*. мРНК была экстрагирована через 3 часа после стимуляции макрофагов агонистами TLR.

в – клетки U87, трансфицированные плазмидой, кодирующей *Tlr2*, отвечают на стимуляцию LPS, полученным от *Porphyromonas gingivalis*, но не на высокоочищенный LPS *E. coli*.

г – клетки U87, трансфицированные плазмидой, кодирующей *Tlr4*, не отвечают на стимуляцию LPS, полученным от *Porphyromonas gingivalis*, но обретают чувствительность к высокоочищенному LPS *E. coli*.

4.1.2 Стимуляция TLR4, в отличие от стимуляции TLR2, вызывает активацию фактора транскрипции STAT-1

Наши дальнейшие исследования использовали синтетический липопептид S-[2,3-бис(пальмитоил-окси)-(2-RS)-пропил]-N-пальмитоил-(R)-Cys-(S)-Ser-Lys₄-OH (Pam3Cys) в качестве агониста TLR2. Целью первой серии экспериментов было определение оптимальной дозы Pam3Cys для стимуляции TLR2, а также подтверждение различий в спектре медиаторов воспаления, индуцируемых агонистами TLR2 и TLR4. Данные, представленные на рисунке 7, полностью подтвердили заключение предыдущего раздела о том, что агонисты TLR2 индуцируют только подгруппу медиаторов воспаления, индуцируемых при активации TLR4 (Рис. 7а и 7б). Так, агонисты обоих TLR приблизительно в равной степени активировали экспрессию IL-1 β и TNF (Рис. 7а и 7б), а также в равной степени вызывали фосфорилирование сайтов активации МАП киназ (Рис.

7с). Вместе с тем, агонисты TLR2, в отличие от агониста TLR4, не активировали экспрессию *MCP-5*, *IP-10* и *iNOS*. Примечательно, что это различие в экспрессии сохранялось в широком диапазоне концентраций агонистов (Рис. 7а), а также в течение длительного времени после стимуляции (Рис. 7б). Вместе с тем не отмечалось существенных различий в активации МАП киназ при стимуляции макрофагов LPS и Pam3Cys (Рис. 7в).

С целью выяснения механизмов, отвечающих за дифференциальную индукцию цитокинов различными LPS, использовались макрофаги, полученные от мышей дефицитных по гену *Tlr4*, а также клетки U87, в норме не отвечающие на агонисты TLR, но трансфицированные плазмидами кодирующими *Tlr2* или *Tlr4*. Мыши линии C3H/HeJ характеризуются мутацией гена *Tlr4*, в следствие чего их клетки не способны отвечать на LPS грамотрицательных энтеробактерий (Poltorak et al., 1998). Перитонеальные макрофаги, полученные от мышей C3H/HeJ, использовались, чтобы выяснить вовлечённость TLR4 в индукцию цито- и хемокинов LPS *E. coli* и *Porphyromonas gingivalis*. Как и ожидалось, клетки, полученные от мышей C3H/HeJ, не отвечали на высокоочищенный *E. coli* LPS (Рис. 6б). Эти клетки, однако, сохраняли полный ответ на *Porphyromonas gingivalis* LPS (Рис. 6б). Аналогичный ответ наблюдался и в клеточной линии U87, трансфицированной плазмидой, запускающей экспрессию TLR2 — клетки отвечали на *Porphyromonas gingivalis* LPS, но не отвечали на стимуляцию LPS, полученным из культуры *E. coli* (Рис. 6в). Клетки U87, экспрессирующие TLR4, напротив, отвечали на *E. coli* LPS, но полностью утрачивали ответ на *Porphyromonas gingivalis* LPS (Рис. 6г). Эксперименты, представленные на рисунке 6, показывают, что LPS, полученные от *E. coli* и *Porphyromonas gingivalis*, активируют иммунный ответ через различные TLR: высокоочищенный *E. coli* LPS активирует TLR4, тогда как *Porphyromonas gingivalis* LPS действует через TLR2. Этот факт, рассмотренный в сочетании с дифференциальной индукцией медиаторов

воспаления этими препаратами LPS, в свою очередь, позволяет заключить, что сигнальные пути, активируемые различными TLR, отличны.

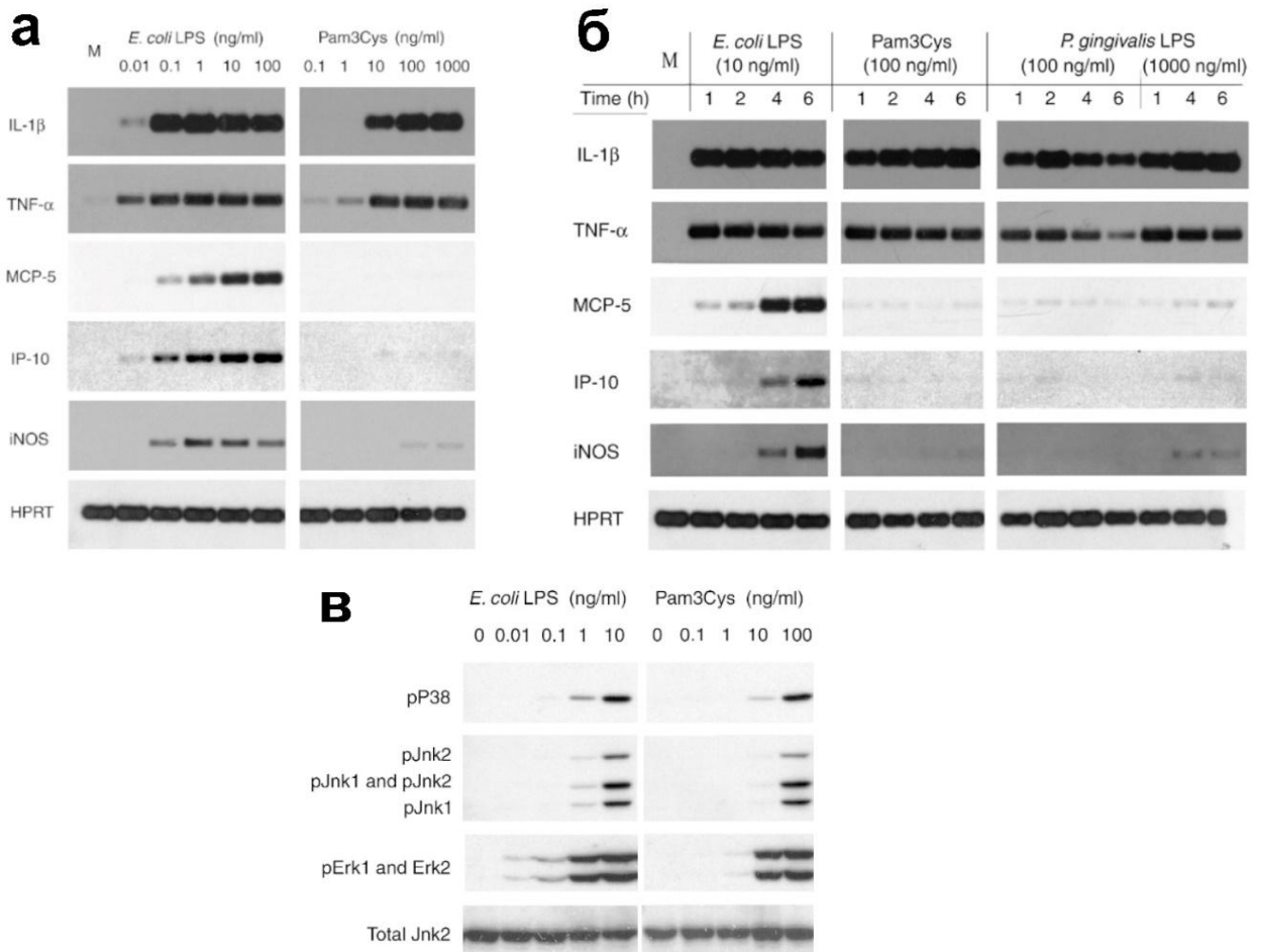


Рисунок 7 — Индукция медиаторов воспаления и активация МАП киназ при стимуляции макрофагов синтетическим агонистом TLR2 (липopeптидом Pam3Cys) в сравнении с индукцией, вызванной агонистом TLR4 (*E. coli* LPS K235) (Toshchakov et al., 2002)

а — дозозависимость экспрессии медиаторов воспаления, индуцированных высокоочищенным *E. coli* LPS K235 или синтетическим липопептидом Pam3Cys. Экспрессия мРНК медиаторов воспаления оценивалась в перитонеальных макрофагах мышей линии СЗН/ОuJ методом ОТ-ПЦР с последующим блоттингом по Саузерну через 3 часа после стимуляции агонистами TLR. Экспрессия *HPRT* оценивалась в качестве контроля.

б – временная зависимость экспрессии медиаторов воспаления перитонеальными макрофагами, стимулированными высокоочищенным *E. coli* LPS K235, синтетическим липопептидом Pam3Cys, или LPS *Porphyromonas gingivalis*.

в – активация МАП киназ при стимуляции перитонеальных макрофагов *E. coli* LPS K235 или синтетическим липопептидом Pam3Cys. Активация МАП киназ (p38, JNK и ERK) оценивалась по уровню фосфорилирования сайтов активации киназ иммуноблоттингом клеточных лизатов, полученных через 30 минут после стимуляции агонистами TLR и подвергнутых ДСН-ЭПАГ, при помощи антител, специфичных к фосфорилированным сайтам.

Индукция *MCP-5*, *IP-10* и *iNOS* зависит от активации фактора транскрипции STAT-1 (Kopydlowski et al., 1999; Ohmori & Hamilton, 2001). Основным механизмом активации STAT-1 является фосфорилирование по сайту Tyr701, осуществляемое JAK-киназами (Agashe et al., 2022). Мы протестировали, не являются ли различия в активации *MCP-5*, *IP-10* и *iNOS* агонистами TLR2 и TLR4 следствием различий в активации STAT-1. Выполненные эксперименты не противоречили гипотезе о критической роли STAT-1 в дифференциальной индукции медиаторов воспаления агонистами TLR2 и TLR4. Так, ни стимуляция культивируемых макрофагов Pam3Cys (Рис. 8а), ни стимуляция LPS *Porphyromonas gingivalis* (Рис. 8б), в отличие от стимуляции LPS *E. coli*, не индуцировала фосфорилирование изоформ STAT-1 по сайту активации Tyr701 (Рис. 8а и 8б).

Микобактериальный растворимый туберкулёзный фактор (STF) является агонистом TLR2 (Jones et al., 2001). STF, подобно другим протестированным агонистам TLR2, Pam3Cys и *Porphyromonas gingivalis* LPS, не активировал STAT-1, в отличие от агониста TLR4 *E. coli* LPS (Рис. 8в). Примечательно, что увеличение дозы Pam3Cys на порядок по сравнению с дозой, вызывающей максимальную индукцию генов, отвечающих на стимуляцию TLR2, а также МАП киназ (Рис. 7а и 7в), нимало

не активировало STAT-1 (Рис. 8г), тем самым подтверждая качественное различие в механизмах активации макрофагов агонистами TLR2 и TLR4.

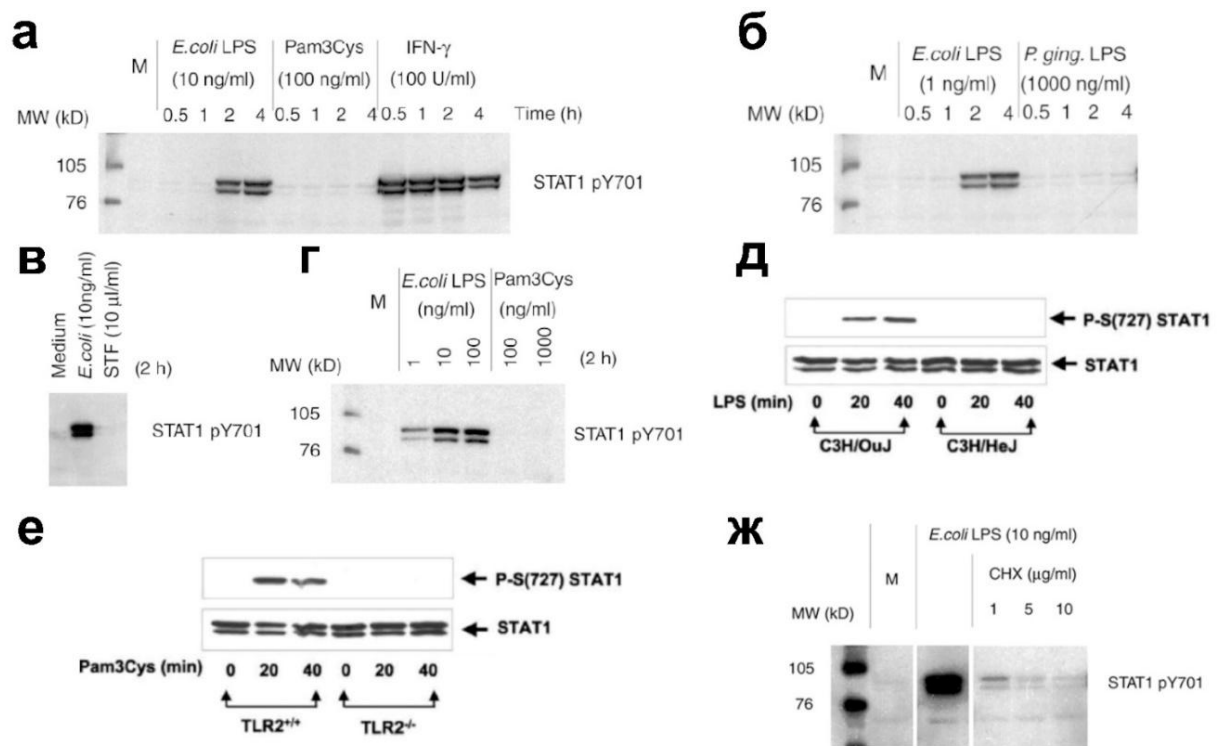


Рисунок 8 — В отличие от агониста TLR4, агонисты TLR2 не активируют фактор транскрипции STAT-1 (Toshchakov et al., 2002)

а – первичная культура перитонеальных макрофагов, полученных от мышей линии C3H/OuJ, была стимулирована высокоочищенным *E. coli* LPS K235, синтетическим липопептидом Pam3Cys или рекомбинантным интерфероном-γ. Активация изоформ STAT-1 альфа и бета оценивалась по уровню фосфорилирования Tyr701 Вестерн-блоттингом клеточных лизатов с использованием антител специфичных к STAT-1 фосфорилированному по сайту Tyr701. В качестве контроля на активацию STAT-1 клетки были простимулированы классическим активатором STAT-1, интерфероном-γ.

б, в – агонисты TLR2, *Porphyromonas gingivalis* LPS (**б**) и STF (mycobacterial soluble tuberculosis factor) (**в**), не активируют STAT-1 аналогично Pam3Cys. Экспериментальные условия аналогичны таковым в эксперименте, представленном на рисунке **8а**.

г – дифференциальная индукция фосфорилирования STAT-1 по сайту Tyr701 сохраняется даже при десятикратном увеличении дозы Pam3Cys. Экспериментальные условия аналогичны таковым в экспериментах, представленных в панелях **8а-в**.

д – кинетика индукции фосфорилирования STAT-1 по сайту Ser727 при активации TLR4. Перитонеальные макрофаги, полученные от мышей линии C3H/OuJ или дефицитной по TLR4 линии C3H/HeJ, были простимулированы *E. coli* LPS в дозе 100 нг/мл и лизированы через указанный промежуток времени. Лизаты фракционировались посредством ДСН-ЭПАГ и анализировались Вестерн-блоттингом с использованием антител к STAT-1 фосфорилированному по сайту Ser727. После проявления антитела удалялись с блотов, и мембраны повторно анализировались антителами, связывающимися как с фосфорилированными, так и с не фосфорилированными формами STAT-1.

е – кинетика индукции фосфорилирования STAT-1 по сайту Ser727 при активации TLR2. Перитонеальные макрофаги, полученные от мышей линии C57BL/6 или линии дефицитной по TLR2, были простимулированы Pam3Cys в дозе 1 мкг/мл и лизированы через указанные промежутки времени. Последующие экспериментальные процедуры аналогичны представленным в описании рисунка 8д.

ж – обработка клеток ингибитором трансляции белка, циклогексимидом, предотвращает фосфорилирование STAT-1 по сайту Tyr701, вызываемое *E. coli* LPS. Макрофаги были предобработаны циклогексимидом за 30 минут до стимуляции *E. coli* LPS. Клеточные лизаты были получены через 2 часа после стимуляции.

Отметим, что при стимуляции TLR4 фосфорилирование по сайту Tyr701 наблюдается с 2-часовой задержкой (Рис. 8), тогда как фосфорилирование STAT-1 по сайту Ser727 (как и активация МАП киназ (Рис. 7в)) происходит в течение приблизительно 30 минут после стимуляции как энтеробактериальным LPS (Рис. 8д), так и Pam3Cys (Рис. 8е) (Rhee et al., 2003). Замедленная активация STAT-1, вызываемая агонистом TLR4, также контрастирует с быстрой активацией этого белка при стимуляции интерфероном γ , одним из прямых активаторов STAT-1 (Рис. 8а). Так, фосфорилирование STAT-1 по сайту Tyr701 наблюдается в полной мере уже через 30 минут после добавления в среду рекомбинантного IFN- γ (Рис. 8а).

Замедленная активация STAT-1 при стимуляции TLR4 может указывать на непрямой механизм активации, включающий в себя синтез промежуточного белкового интермедиата. Гипотеза об участии белкового интермедиата подтверждается представленными на рисунке 8ж экспериментами, показывающими, что ингибирование белкового синтеза циклогексимидом (CHX) предотвращает TLR4-зависимую активацию STAT-1 (Рис. 8ж).

4.1.3 Ранняя индукция IFN- β при активации TLR4 ответственна за активацию STAT-1 и различия в спектрах цитокинов, индуцируемых агонистами TLR2 и TLR4

Эксперименты, представленные на рисунке 8, показали, что дифференциальная активация фактора транскрипции STAT-1 с участием промежуточного белкового интермедиата объясняет различия в спектрах медиаторов воспаления, индуцируемых TLR2 и TLR4, однако оставляют не идентифицированным белок, ответственный за активацию STAT-1 при стимуляции TLR4. STAT-1 активируется интерферонами всех известных типов (Walter, 2020). Чтобы прояснить, какой из интерферонов ответственен за TLR4-зависимую активацию STAT-1, мы проанализировали экспрессию мРНК интерферонов β и γ при стимуляции TLR4 и TLR2. Эксперименты подтвердили дифференциальную индукцию обоих интерферонов, так как наблюдаемая экспрессия при стимуляции агонистами TLR2 была более чем на порядок меньше (Рис. 9а и 9б). Кинетика активации интерферонов агонистом TLR4 также показывала существенные различия: IFN- β индуцировался гораздо раньше IFN- γ . Максимальная экспрессия IFN- β наступала уже через час после стимуляции TLR4, тогда как для достижения полной экспрессии IFN- γ требовалось 6 часов (Рис. 9а). Поздняя активация экспрессии IFN- γ агонистом TLR4 позволяет исключить роль этого цитокина в TLR4-зависимой индукции

STAT-1, поскольку STAT-1 активируется раньше значимой активации экспрессии IFN- γ .

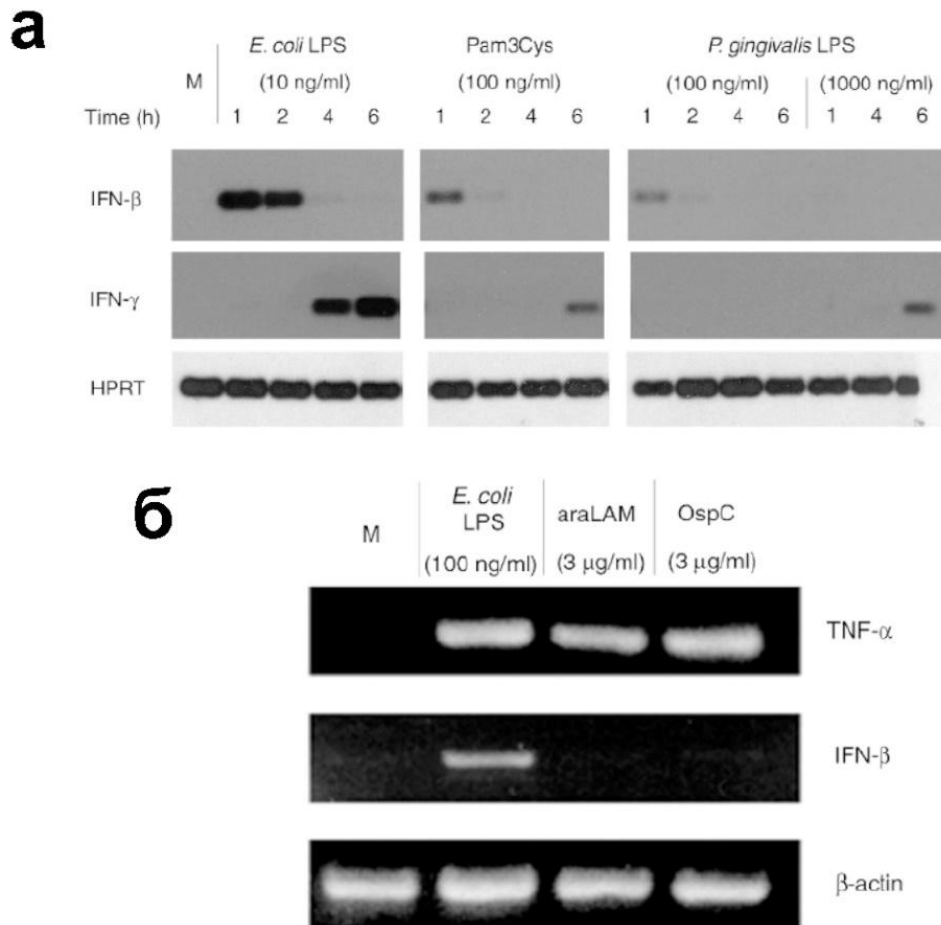


Рисунок 9 — Индукция экспрессии интерферонов агонистами TLR4 и TLR2 (Toshchakov et al., 2002)

а – временная зависимость экспрессии мРНК IFN- β и IFN- γ при стимуляции TLR4 и TLR2. Перитонеальные макрофаги мышей линии C3H/OuJ были стимулированы агонистом TLR4 высокоочищенным *E. coli* LPS K235 или агонистами TLR2 синтетическим липопептидом Pam3Cys или *Porphyromonas gingivalis* LPS. Экспрессия мРНК оценивалась методом ОТ-ПЦР с последующим блоттингом по Саузерну. Экспрессия *HPRT* оценивалась в качестве контроля.

б – агонисты TLR2, гликолипид araLAM и липопротеин OspC, в отличие от агониста TLR4 *E. coli* LPS, не активируют экспрессию IFN- β . Культивируемые клетки макрофагальной линии RAW 264.7 были простимулированы агонистами TLR и лизированы через 2 часа после стимуляции. Выделенная из лизатов общая РНК

подвергалась ОТ-ПЦР с использованием праймеров специфичных для мРНК TNF, IFN- β , или β -актина с последующим разгоном продуктов на полиакриламидном геле и их визуализацией путём окрашивания этидиум бромидом.

Помимо интерферона β , STAT-1 может активироваться интерферонами α . Вследствие множественности генов, кодирующих IFN- α , изучение участия IFN- α в индукции STAT-1 методом ОТ-ПЦР затруднено. В связи с этим, мы использовали блокирующие моноклональные антитела, специфичные к IFN- α и IFN- β , для выяснения роли интерферонов первого типа в индукции STAT-1 при активации TLR4. Добавление антител специфичных к IFN- α не влияло на фосфорилирование STAT-1 по сайту Tyr701, тогда как антитела к IFN- β значительно снижали активацию STAT-1 (Рис. 10а). Неполное подавление сигнала, наблюдаемое при использовании даже минимального разведения антител к IFN- β (Рис. 10а), вероятно, связано с аутокринным механизмом активации STAT-1, предполагающим, что секретируемый клеткой IFN- β может действовать на локальные рецепторы, находящиеся на той же клетке, таким образом затрудняя связывание этого цитокина экзогенными блокирующими антителами. Эффективность и специфичность использовавшихся блокирующих антител была подтверждена в эксперименте, в котором фосфорилирование STAT-1 индуцировалось рекомбинантными интерферонами первого типа (Рис. 10б). Оба использовавшихся антитела эффективно блокировали активацию STAT-1, вызванную соответствующим рекомбинантным интерфероном, но не оказывали неспецифического, перекрёстного действия (Рис. 10б).

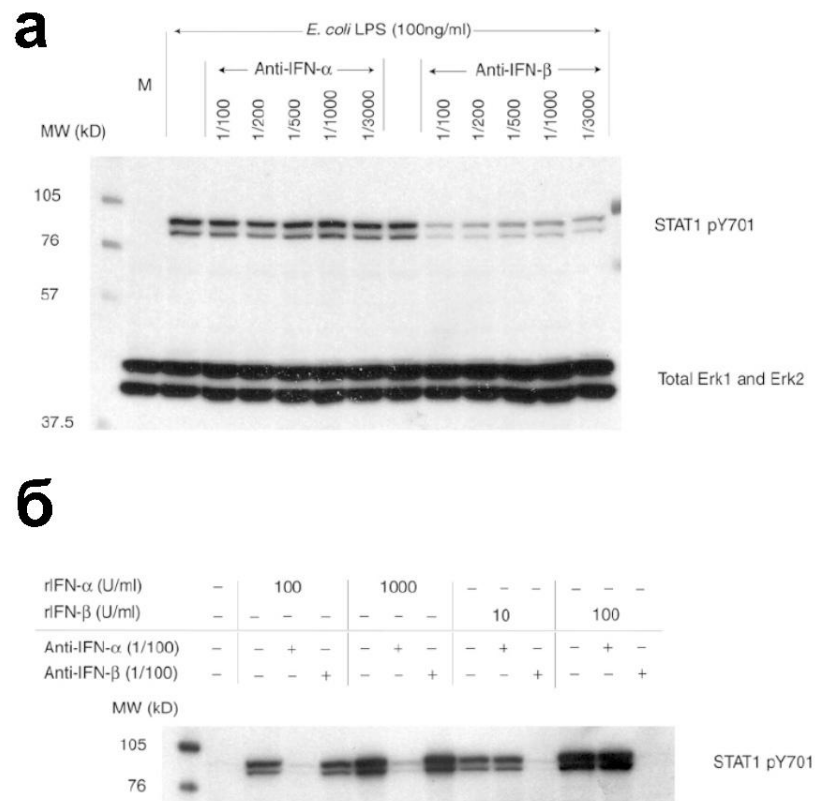


Рисунок 10 — Активация STAT-1 при стимуляции TLR4 подавляется моноклональными антителами к IFN-β, но не моноклональными антителами к IFN-α (Toshchakov et al., 2002)

а – моноклональные антитела к IFN-β подавляют активацию STAT-1 при стимуляции TLR4. Культивируемые перитонеальные макрофаги мышей линии СЗН/OuJ были предобработаны моноклональными антителами в указанных разведениях за 5 минут до стимуляции высокоочищенным *E. coli* LPS K235. Клетки лизировались через 2 часа после стимуляции. Полученные лизаты фракционировались посредством ДСН-ЭПАГ и анализировались Вестерн-блоттингом с использованием антител к STAT-1 фосфорилированному по сайту Tyr701. Нижняя часть мембраны проявлялась антителом специфичным к МАП киназам ERK1 и ERK2, но не различающим фосфорилированные и не фосфорилированные формы этих белков.

б – контроль специфичности антител, применённых в экспериментах, представленных на рисунке 9а. Детали экспериментов аналогичны экспериментам, представленным на рисунке 9а, за исключением того, что вместо LPS клетки

стимулировались рекомбинантными интерферонами в указанных концентрациях и лизировались через 30 минут после стимуляции, а не через 2 часа.

Целью следующей серии экспериментов было выяснение влияния экзогенного IFN- β на спектр медиаторов воспаления, секретируемых агонистами TLR2. Изучалась экспрессия *MCP-5*, *IP-10*, *iNOS*, т.е. генов, не индуцируемых при стимуляции TLR2, в отличие от TLR4 (Рис. 11). Ответы различных генов на активацию рецептора интерферонов первого типа (и последующую активацию STAT-1) отличались. Так, IFN- β вызывал быструю (уже в течение первого часа после стимуляции) активацию экспрессии *MCP-5* и без дополнительной стимуляции TLR (Рис. 11), тогда как экспрессия *IP-10* значительно усиливалась как при костимуляции агонистом TLR4, так и при активации TLR2 (Рис.10). IFN- β не индуцировал *iNOS* без костимуляции и не усиливал экспрессию, вызываемую агонистом TLR4 (Рис. 11), однако оказывал значительное синергическое действие на экспрессию при костимуляции с Pam3Cys (Рис. 11).

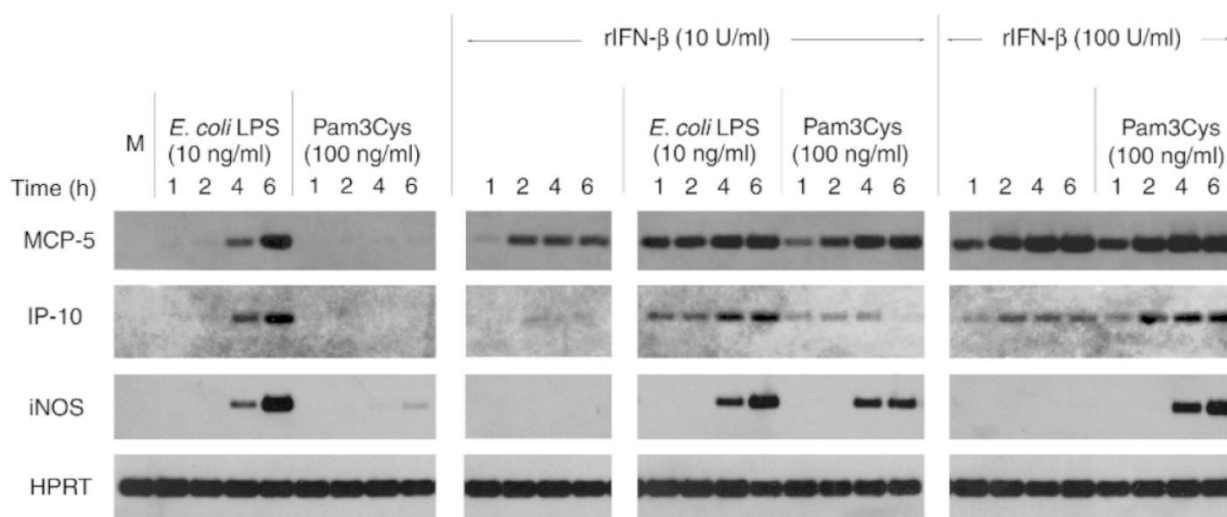


Рисунок 11 — Костимуляция интерфероном β нивелирует различия в спектрах медиаторов воспаления, индуцируемых агонистами TLR4 и TLR2 (Toshchakov et al., 2002)

Культивируемые перитонеальные макрофаги мышей линии C3H/OuJ были простимулированы агонистами TLR4, TLR2, или рекомбинантным IFN- β отдельно или в сочетании. Экспрессия *MCP-5*, *IP-10*, *iNOS* и *HPRT* оценивалась в клеточных экстрактах методом ОТ-ПЦР с последующим блоттингом по Саузерну.

Представленные данные убедительно показывают, что костимуляция интерфероном β устраняет различия в экспрессии медиаторов воспаления, наблюдаемые при стимуляции агонистами TLR4 и TLR2, и, таким образом, подтверждают ключевую роль ранней индукции интерферона β с последующей активацией фактора транскрипции STAT-1 в генезисе этих различий.

4.1.4 TLR4-зависимое фосфорилирование STAT-1 по сайту Tyr701 и экспрессия мРНК интерферона β не зависят от присутствия адаптерного белка MyD88

За исключением TLR3, адаптерный белок MyD88 участвует в передаче сигнала со всех рецепторов млекопитающих, внутриклеточным сигнальным модулем которых является TIR домен (Kawai & Akira, 2011). Поскольку и TLR2, и TLR4 используют MyD88 для передачи сигнала, представляется логичным предположить, что дифференциальная активация интерферона β при активации TLR4 осуществляется без участия этого адаптера. Эта гипотеза была проверена в экспериментах, результаты которых представлены на рисунке 12. Эти эксперименты показали, что макрофаги, полученные от мышей, дефицитных по гену MyD88, практически в полной мере сохраняли способность активировать STAT-1 (Рис. 12а) и экспрессировать IFN- β мРНК (Рис. 12б) в ответ на стимуляцию энтеробактериальным LPS.

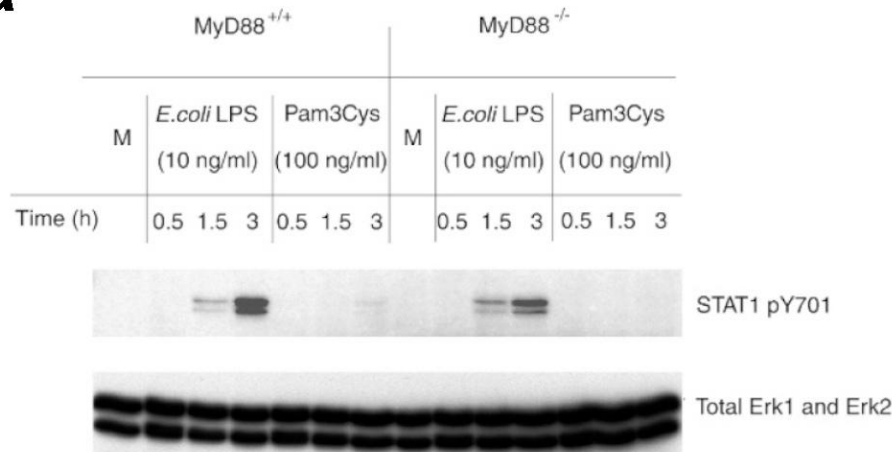
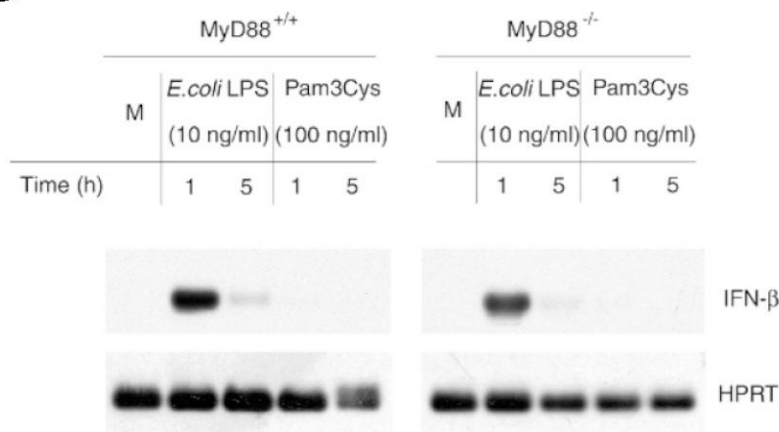
а**б**

Рисунок 12 — Активация STAT-1 и индукция экспрессии IFN- β при стимуляции TLR4 не зависит от присутствия адаптерного белка MyD88 (Toshchakov et al., 2002)

а, б – перитонеальные макрофаги, полученные от мышей дикого типа или мышей, нокаутных по гену *MyD88*, были стимулированы *E. coli* LPS или Pam3Cys и лизированы через указанные промежутки времени. **(а)** Полученные лизаты фракционировались посредством ДСН-ЭПАГ и анализировались Вестерн-блоттингом с использованием антител к STAT-1 фосфорилированному по сайту Tyr701. Нижняя часть мембраны проявлялась антителом, специфичным к МАП киназам ERK1 и ERK2, но не различающим фосфорилированные и нефосфорилированные формы этих белков. **(б)** Выделенная мРНК подвергалась ОТ-ПЦР с использованием праймеров, специфичных к

IFN- β и *HPRT* мРНК, и последующим блоттингом по Саузерну с использованием проб, специфичных к *IFN- β* и *HPRT*.

Материалы, представленные в разделе 4.1, продемонстрировали различия в спектрах медиаторов воспаления, индуцируемых при активации различных TLR, и показали, что TLR4, в отличие от TLR2, способен активировать дополнительный сигнальный путь, ведущий к дифференциальной индукции интерферона β с последующей активацией фактора транскрипции STAT-1. Открытие этого TLR4-зависимого, MyD88-независимого сигнального пути в явном виде продемонстрировало способность TIR доменов взаимодействовать специфически и послужило основанием для последующего открытия TRIF-зависимого сигнального пути, специфичного для TLR3 и TLR4 (Oshiumi, Matsumoto, et al., 2003a; Oshiumi, Sasai, et al., 2003b; Yamamoto, Sato, Hemmi, Hoshino, et al., 2003a; Yamamoto, Sato, Hemmi, Uematsu, et al., 2003a; Yamamoto, Sato, Mori, et al., 2002a).

4.2 Демонстрация мультивалентности взаимодействий TIR доменов

Долгое время после открытия структуры TIR доменов единственным известным сайтом, осуществляющим межбелковые взаимодействия, считалась петля, соединяющая второй тяж со вторым спиральным участком, петля BB. Понимание того, что этот участок формирует функционально важный сайт связывания, основывалось на нескольких независимых наблюдениях. Во-первых, мутация гена *Tlr4*, являющаяся причиной нечувствительности мышей линии C3H/HeJ к LPS, соответствует Pro/His замене, находящейся в этой петле (Poltorak et al., 1998; Rock et al., 1998; Xu et al., 2000). Во-вторых, петля BB является одним из трёх участков, последовательность которого в высокой степени сохранна в TIR доменах

метазой (Slack et al., 2000), причём петля BB является единственным из трёх сохранных участков, который располагается на поверхности белка и, соответственно, способна осуществлять взаимодействия с другими белками. В-третьих, искусственные мутации в этом участке TIR доменов вызывали потерю функции полноразмерных белков. Наконец, блокирующие пептиды, соответствующие петле BB всех четырёх адаптерных белков, а также TLR2 и TLR4, блокировали передачу сигнала (Toshchakov et al., 2005; Toshchakov et al., 2007).

Вместе с тем становилось понятным, что сигнал-зависимая сборка функционального комплекса при активации TLR осуществляется за счет более чем одного сайта TIR-TIR взаимодействий, существующих на каждом из участвующих TIR доменов. Одним из аргументов, свидетельствующих в пользу существования множественных сайтов, осуществляющих взаимодействия TIR доменов при активации TLR, была идентификация 4-х TIR-содержащих адаптерных белков, при том что два из этих адаптеров не выполняют самостоятельной роли, а способны функционировать только в связке с одним из мультидоменных адаптеров (Toshchakov and Vogel, 2007). Однако позиции дополнительных сайтов и их количество оставались неизвестными на то время.

4.2.1 Скрининг первой библиотеки блокирующих пептидов TIR домена (библиотека TIR домена TLR4)

Попыткой подтвердить существование множественных сайтов связывания TIR доменов на поверхности каждого из членов семейства и локализовать позиции TIR-TIR взаимодействий явилось наше исследование, в котором была впервые скринирована полная библиотека блокирующих пептидов TIR домена (Toshchakov et al., 2011). Библиотека состояла из 11 пептидов и была составлена таким образом, что каждый из пептидов библиотеки представлял участок первичной последовательности TIR домена TLR4, формирующего нефрагментированный участок

поверхности домена, тогда как библиотека в целом представляла всю поверхность TIR домена TLR4 (Рис. 13а). Каждый из пептидов библиотеки был дополнен пептидным вектором пенетратинном, происходящим из белка дрозофилы *Antennapedia homeodomain* (Derossi et al., 1994). Полные последовательности использовавшихся пептидов TIR домена TLR4 приведены в таблице 1.

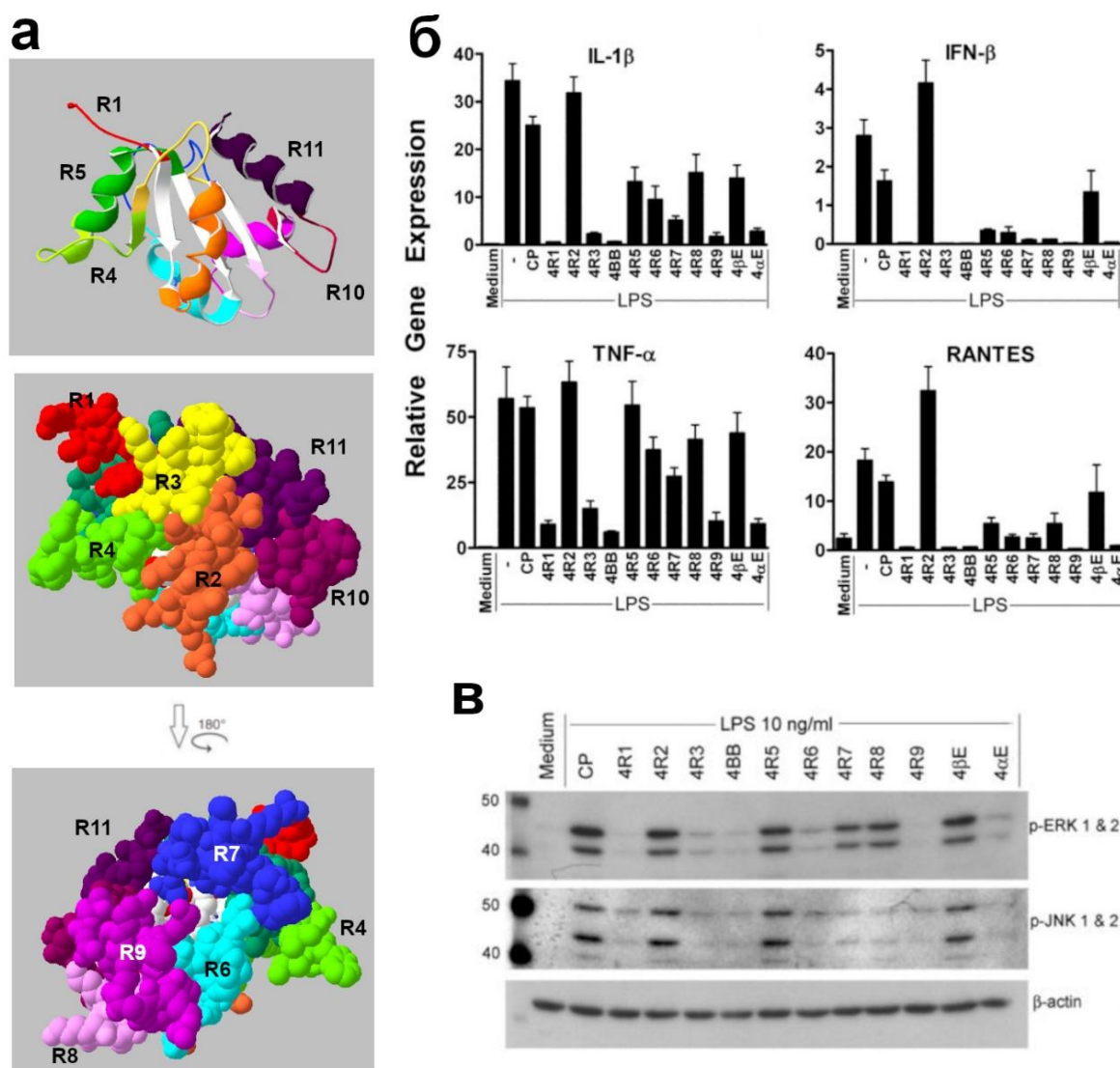


Рисунок 13 — Пример дизайна пептидной библиотеки, представляющей отдельные участки поверхности TIR домена и результаты скрининга библиотеки пептидов, представляющих TIR домен TLR4, на экспрессию цитокиновой мРНК и активацию МАП киназ ERK и JNK при стимуляции перитонеальных макрофагов мышей LPS *E. coli* (Toshchakov et al., 2011).

а – структурные модели TIR домена, показывающие в различных цветах сегменты последовательности (верхняя панель) и соответствующие им участки поверхности домена (средняя и нижняя панели), представляемые отдельными пептидами. Изображения показывают модель TIR домена TLR2, на то время одну из двух известных структур изучаемых в работе TIR доменов (PDB ID: 1FYW). Изображения получены с помощью программного пакета Swiss-PdbViewer (Guex and Peitsch, 1997). Участки последовательности, показанные в белом цвете в верхней панели, не включались в состав пептидов библиотеки, поскольку эти участки формируют гидрофобное ядро домена и не экспонированы на поверхности.

б – перитонеальные макрофаги, полученные от мышей линии C57BL/6J, были обработаны контрольным проникающим пептидом (CP) или пептидами, представляющими различные участки поверхности TIR домена TLR4. Пептиды применялись в конечной концентрации 40 μ M. Через 30 минут после обработки пептидами клетки стимулировались *E. coli* LPS и лизировались через 1 час после стимуляции. Экспрессия мРНК цитокинов оценивалась методом ОТ-ПЦР с детекцией продукта в режиме реального времени и была нормализована на экспрессию *Hprt*. Пептиды 4BB, 4 β E и 4 α E соответствовали показанным в панели 13а регионам R4, R10 и R11, соответственно.

в – перитонеальные макрофаги обрабатывались пептидами и LPS как указано в подписи к рисунку 13а и лизировались через 30 минут после стимуляции. Активация МАП киназ оценивалась Вестерн-блоттингом с использованием антител, специфичных к формам киназ фосфорилированным по Thr202/Tyr204 (ERK) и Thr183/Tyr185 (JNK).

Полученные результаты скрининга библиотеки на способность отдельных пептидов блокировать индукцию цитокинов и активацию МАП киназ при стимуляции перитонеальных макрофагов мышей *E. coli* LPS согласовывались с гипотезой о множественности сайтов связывания, присутствующих на TIR доменах. Помимо пептида, представляющего петлю BB, обработка клеток четырьмя другими пептидами также приводила к подавлению как цитокинового ответа на стимуляцию клеток LPS, так и активации МАП киназ (Рис. 13б и 13в) (Toshchakov et al., 2011). Ингибиторные пептиды представляли следующие структурные элементы

домена: участок, соединяющий TIR домен с трансмембранной спиралью, петли AB и BB, а также четвёртую и пятую α -спирали (Рис. 13). Эти пептиды (обозначенные 4R1, 4R3, 4BB, 4R9 и 4 α E, (Табл. 1)), эффективно блокировали экспрессию цитокинов, измеренную через час после стимуляции клеток (Рис. 13б). Те же пептиды вызывали мощное подавление активации МАП киназ, индуцированное введением LPS (Рис. 13в).

Последующие эксперименты были посвящены изучению специфичности эффекта пептидов на передачу сигнала различными TLR. Сравнивались эффекты пептидов, обладающих наиболее выраженным ингибирующим действием на активацию макрофагов LPS, с их действием, оказываемым на активацию, индуцируемую агонистами TLR2 (Рис. 14). Использовались два агониста TLR2, Pam2Cys и Pam3Cys, первый из которых известен как агонист, активирующий гетеродимер TLR2 с TLR6 (Takeuchi et al., 2001), тогда как Pam3Cys действует через гетеродимер TLR2 с TLR1 (Takeuchi et al., 2002). Эксперименты показали, что действие пептидов в значительной степени специфично. Так, если пептиды уменьшали LPS-индуцированную экспрессию *Tnf* на 90–95%, те же пептиды не оказывали статистически достоверного влияния на экспрессию, индуцированную агонистами TLR2 (Рис. 14а). Аналогичная селективность действия пептидов также наблюдалась и в отношении активации МАП киназ при стимуляции макрофагов агонистами TLR4 и TLR2 (Рис. 14б).

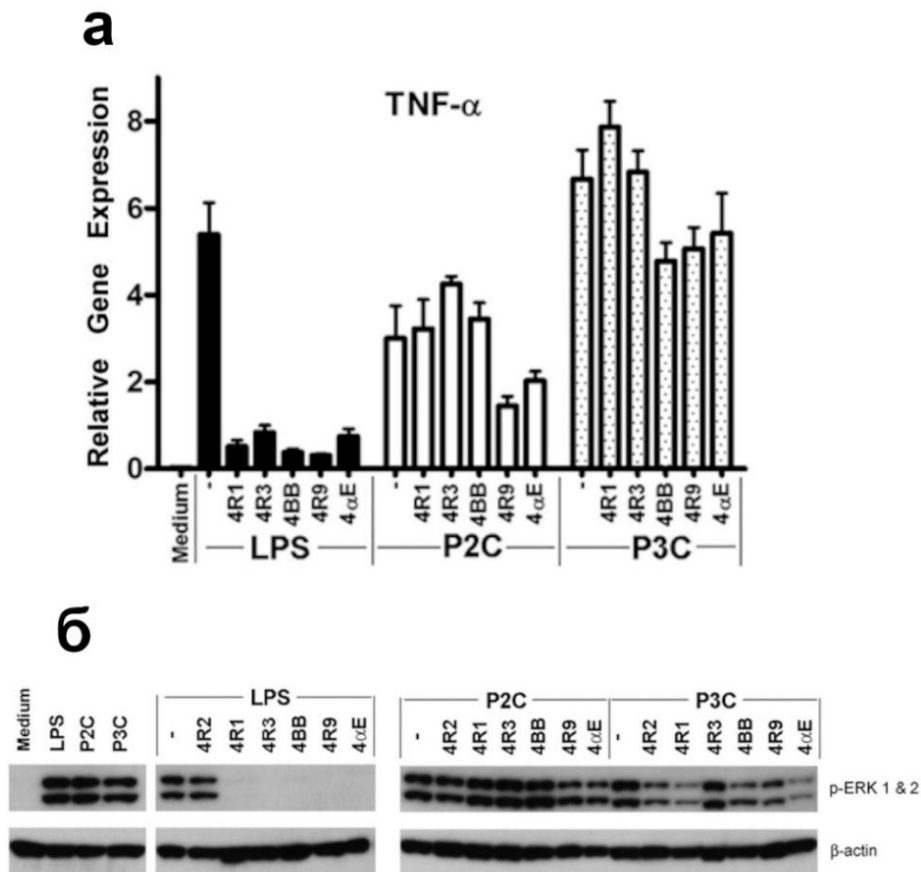


Рисунок 14 — Специфичность действия блокирующих пептидов в отношении экспрессии *TNF* и фосфорилирования МАП киназ, индуцированных агонистами TLR 4 и TLR 2 (Toshchakov et al., 2011)

а – Влияние пептидов библиотеки TLR4 на экспрессию *Tnf*, индуцированную агонистом TLR4 (*E. coli* LPS) или агонистами TLR2 (P2C и P3C). Перитонеальные макрофаги мышей линии C57BL/6J были инкубированы в течение 30 мин в присутствии 40 μM пептидов, представляющих отдельные участки поверхности TIR домена TLR4, и стимулированы *E. coli* LPS или агонистами TLR2. Пробы РНК отбирались через 1 час после стимуляции. Экспрессия *Tnf* оценивалась методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени и нормализовалась на экспрессию *Hprt*.

б – Влияние пептидов на фосфорилирование ERK, индуцированное агонистом TLR4 или агонистами TLR2. Перитонеальные макрофаги обрабатывались пептидами и агонистами TLR как указано выше, и лизировались через 30 минут после стимуляции LPS или P3C и через 15 минут после стимуляции P2C.

4.2.2 Скрининг пептидных библиотек TIR доменов различных TLR

Результаты скрининга библиотеки пептидов, полно представляющей TIR домен TLR4, с одной стороны не противоречили гипотезе о множественности сайтов взаимодействия TIR доменов, а с другой стороны продемонстрировали, что пептиды библиотеки TIR домена TLR4 специфичны в отношении сигнала, индуцируемого агонистами TLR4 и TLR2. Последнее наблюдение, вместе со значительной вариабельностью последовательностей различных TIR доменов, послужило основанием для скрининга дополнительных библиотек с целью идентификации блокирующих пептидов, специфичных для других TLR. На протяжении последующих лет нами были выполнены скрининги библиотек пептидов, представляющих TIR домены TLR2, TLR1, TLR6, TLR7, TLR9 и TLR5 (домены перечислены в хронологической последовательности выполнения исследований), и результаты опубликованы в серии статей (Javmen et al., 2018, 2020, 2023; Piao et al., 2015, 2016). Дизайн пептидных библиотек, представляющих различные TLR, был аналогичен описанной выше библиотеке TLR4. Все библиотеки изначально состояли из 11 пептидов, каждый из которых представлял определённый элемент третичной структуры TIR домена, тогда как все пептиды библиотеки в совокупности представляли поверхность определённого TIR домена целиком. Последовательности тестируемых пептидов приведены в таблице 1.

4.2.2.1 Скрининг пептидной библиотеки TIR домена TLR2

В первичном скрининге библиотеки блокирующих пептидов TIR домена TLR2 сравнивалось действие пептидов на экспрессию цитокинов, индуцированную агонистами TLR2 (Piao et al., 2015). Для активации TLR2 использовали 2 липопептида: триацилированный липопептид P3C, лиганд активирующий TLR2/TLR1 гетеродимер (Takeuchi et al., 2002), и диацилированный липопептид P2C, являющийся активатором TLR2/TLR6 гетеродимера (Takeuchi et al., 2001). Результаты скринингов представлены

на рисунке 15, панели **а** и **б**. Пептид, представляющий участок, соединяющий TIR домен с трансмембранным участком рецептора (пептид 2R1), а также пептид, происходящий из 4-й α -спирали TIR домена (2R9), оказывали выраженное ингибирующее действие в отношении экспрессии, индуцированной обоими агонистами (Рис. 15а и б). Пептид 2R3 также ингибировал экспрессию TNF и IL-1 β , однако его действие было менее выражено (Рис. 15а и б). Фибробласт-стимулирующий пептид 1 (FSL-1) активирует продукцию цитокинов, задействуя TLR2/TLR6 гетеродимер. FSL-1-зависимая экспрессия цитокинов ингибировалась пептидами 2R1 и 2R9 аналогично экспрессии, индуцированной P2C (Рис. 15с).

Пептиды 2R1 и 2R9 эффективно блокировали фосфорилирование киназы IKK α/β , индуцированное как P3C, агонистом, действующим через TLR2/TLR1 гетеродимер (Рис. 15г), так и агонистами TLR2/TLR6 гетеродимера, P2C и FSL-1 (Рис. 15д, е). Оба пептида также блокировали активацию МАП киназ, индуцированную P3C (Рис. 15г), однако не оказывали аналогичного действия на активацию МАП киназ, индуцированную агонистами TLR2/TLR6 гетеродимера (Рис. 15д, е).

Влияние пептидов на более поздние проявления активации макрофагов оценивались по секреции цитокинов. Оценивалось содержание TNF и IL-6 в 5-ти и 24-х часовых супернатантах перитонеальных макрофагов, стимулированных агонистами TLR2. Данные ИФА полностью подтвердили наблюдения, представленные на рисунке 15, – пептиды 2R1, 2R9 и в меньшей степени 2R3 ингибировали секрецию TNF и IL-6 макрофагами, стимулированными агонистами TLR2 (Рис. 16). Следует отметить, что ингибирование было приблизительно в равной степени эффективно в отношении IL-6, несмотря на то, что продукция этого цитокина осуществляется с некоторой задержкой, что можно видеть по существенному различию в содержании IL-6 в 5-ти- и 24-х-часовых супернатантах (Рис. 16а и б, нижние панели).

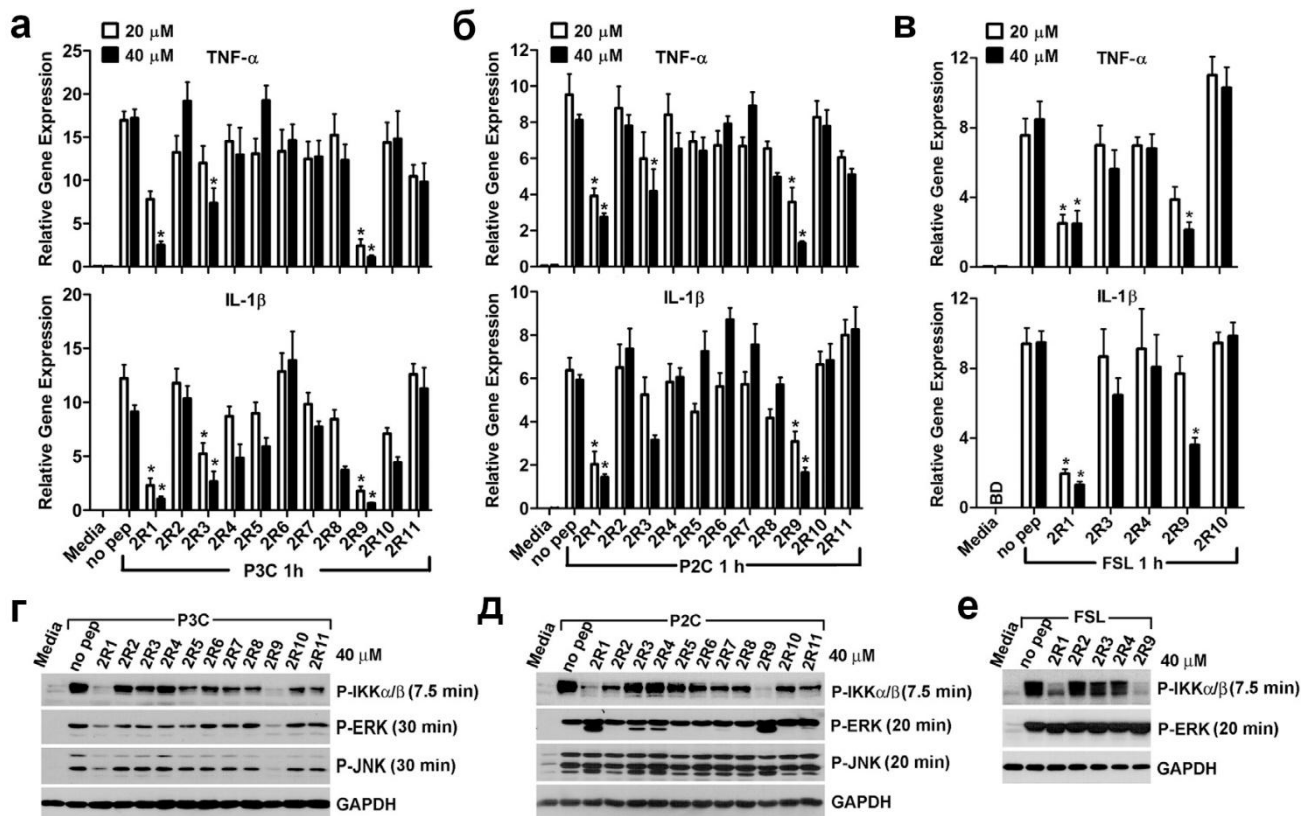


Рисунок 15 — Блокирование сигнала TLR2 пептидами, происходящими из TIR домена TLR2 (Piao et al., 2015)

а – влияние пептидов на экспрессию *Tnf* и *Il-1β*, индуцированную триацилированным липопептидом P3C (агонист TLR2/TLR1 гетеродимера). Перитонеальные макрофаги мышей линии C57BL/6J были инкубированы в течение 30 мин в присутствии 20 или 40 μM пептидов, представляющих отдельные участки поверхности TIR домена TLR2, и стимулированы P3C. Пробы РНК отбирались через 1 час после стимуляции. Экспрессия цитокинов оценивалась методом ОТ-ПЦР и нормализовалась на экспрессию *Hprt*.

б – влияние пептидов на экспрессию *Tnf* и *Il-1β*, индуцированную диацелированным липопептидом P2C (агонист TLR2/TLR6 гетеродимера). Перитонеальные макрофаги мышей линии C57BL/6J были инкубированы в течение 30 мин в присутствии 20 или 40 μM пептидов, представляющих отдельные участки поверхности TIR домена TLR2, и стимулированы P2C. Пробы РНК отбирались через 1 час после стимуляции. Экспрессия цитокинов оценивалась методом ОТ-ПЦР и нормализовалась на экспрессию *Hprt*.

в – влияние пептидов на экспрессию *Tnf* и *Il-1 β* индуцированную фибробласт-стимулирующим липопептидом 1 (FSL-1), являющимся агонистом TLR2/TLR6 гетеродимера. Остальные детали экспериментов аналогичны экспериментам, представленным в панелях **а** и **б**.

г – влияние пептидов TIR домена TLR2 на фосфорилирование белков при активации клеток липопептидом P3C. Перитонеальные макрофаги мышей линии C57BL/6J были инкубированы в течение 30 мин в присутствии 40 μ M пептидов, представляющих отдельные участки поверхности TIR домена TLR2, и стимулированы P3C (500 нг/мл). Белковые лизаты получали через указанные интервалы времени после стимуляции клеток и анализировали Вестерн блоттингом при помощи антител, специфичных для фосфорилированных форм указанных белков.

д – влияние пептидов TIR домена TLR2 на фосфорилирование белков при стимуляции клеток P2C. Детали экспериментов как в панели **г**. P2C добавляли до конечной концентрации 50 нг/мл.

е – влияние отдельных пептидов TIR домена TLR2 на фосфорилирование белков при стимуляции клеток FSL-1 (50 нг/мл). Остальные детали экспериментов аналогичны представленным в панели **г**.

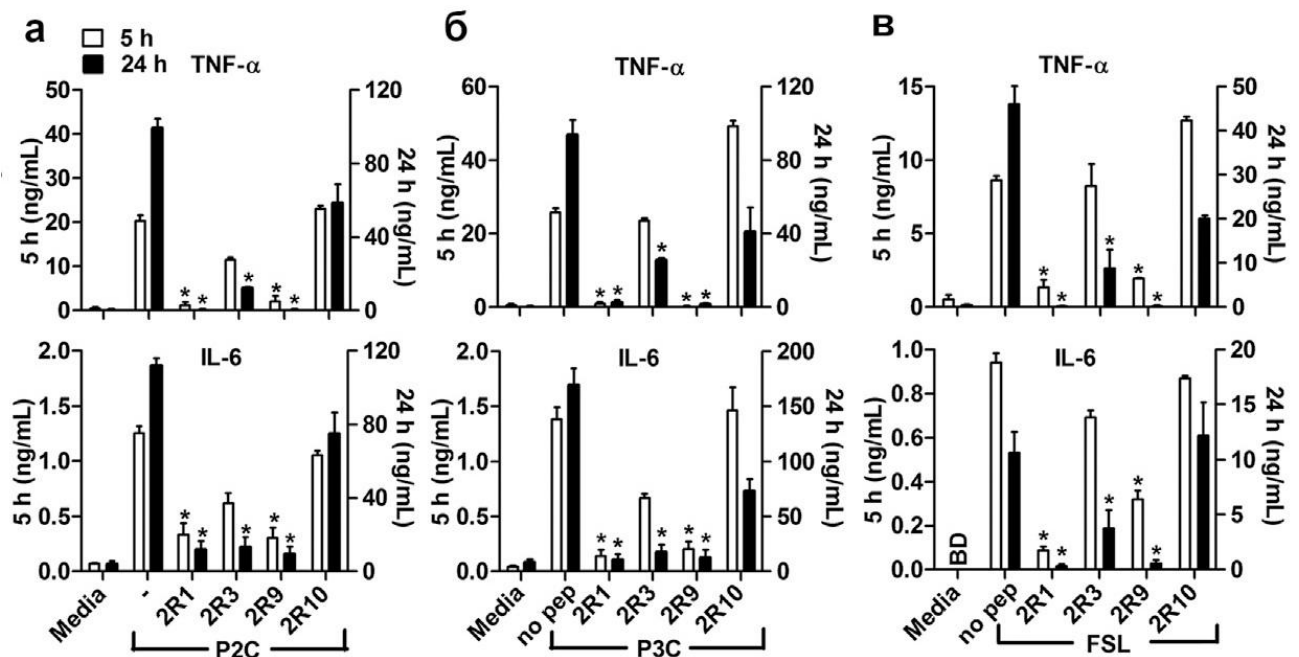


Рисунок 16 — Влияние пептидов на секрецию TNF и IL-6 перитонеальными макрофагами мышей линии C57BL/6J (Piao et al., 2015)

Клетки инкубировались в течение 30 мин в присутствии 40 μ M пептидов и стимулировались P2C (50 нг/мл) (**а**), P3C (500 нг/мл) (**б**) или FSL (50 нг/мл) (**в**). Супернатанты для определения содержания цитокинов отбирались через 5 (белые колонки, левая шкала Y) и 24 (чёрные колонки, правая шкала Y) часа после стимуляции.

Специфичность действия TLR2-блокирующих пептидов оценивалась по их влиянию на активацию цитокинов, индуцированную TNF и специфическими активаторами различных членов семейства TLR. Пептид 2R9 не оказывал существенного влияния на TNF-индуцированную экспрессию *Tnf* и *Il-1 β* (Рис. 17а и б), однако пептид 2R1 несколько снижал экспрессию обоих цитокинов (Рис. 17а и б), что связывалось с влиянием этого пептида на жизнеспособность клеток (Piao et al., 2015). Это наблюдение послужило основанием для исключения пептида 2R1 из дальнейших тестов специфичности. Исследование специфичности действия пептида 2R9 на различных членов семейства TLR показало, что 2R9 эффективно подавляет экспрессию цитокинов, индуцированную активацией TLR4 (Рис. 17в и г), а также TLR7 и TLR9 (Рис. 17д и е), но не оказывает существенного влияния на секрецию IFN- β и фосфорилирование транскрипционного фактора STAT-1 при стимуляции TLR3 двуцепочечной РНК (Рис. 17ж и з).

В заключение этого раздела можно констатировать, что скрининг библиотеки пептидов TIR домена TLR2 выявил мультиспецифический ингибитор TLR, который происходит из 4-й α -спирали TIR домена TLR2 и ингибирует сигнал TLR2, TLR4, TLR7 и TLR9. Представленные наблюдения позволили предположить, что 2R9 оказывает ингибиторное действие за счёт связывания TIR-содержащего адаптерного белка MyD88-зависимого сигнального пути. Это предположение будет подтверждено представленными ниже данными по связыванию 2R9 различными TIR доменами.

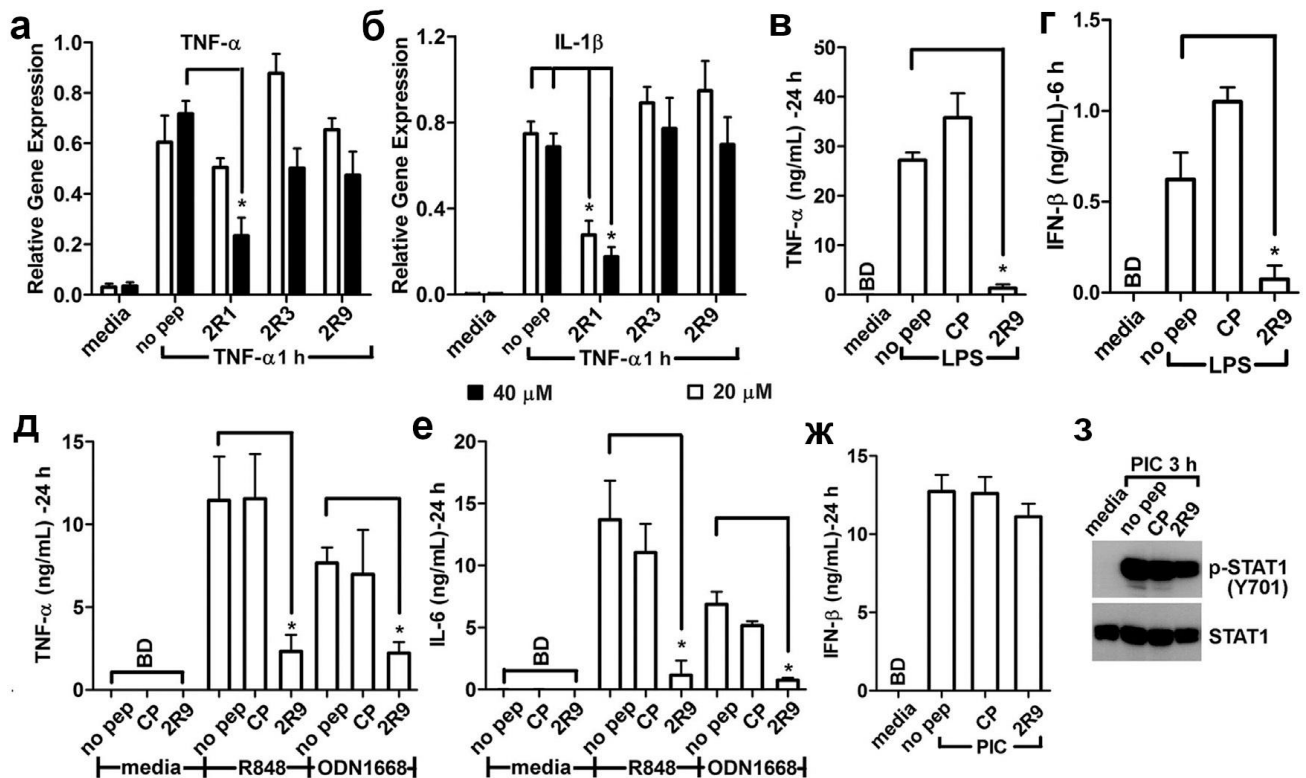


Рисунок 17 — Специфичность действия ингибиторных пептидов, происходящих из TIR домена TLR2, в отношении различных сигнальных путей (Piao et al., 2015)

а, б – влияние пептидов на TNF-индуцированную экспрессию *Tnf* (**а**) и *Il-1β* (**б**). Перитонеальные макрофаги мышей линии C57BL/6J были инкубированы в течение 30 мин в присутствии 20 (белые колонки) или 40 μM (черные колонки) пептидов. Пробы РНК отбирались через 1 час после стимуляции. Экспрессия цитокинов оценивалась методом ОТ-ПЦР и нормализовалась на экспрессию *Hprt*.

в-ж – влияние пептида 2R9 и контрольного пептида (CP) на секрецию цитокинов перитонеальными макрофагами, стимулированными агонистами различных TLR: LPS (TLR4) (**в** и **г**), резихимодом (R848) (TLR7) (**д** и **е**), олигонуклеотидом ODN1668 (TLR9) (**д** и **е**) и полиинозиновой-полицитидиновой РНК (PIC) (TLR3) (**ж**). Агонисты применялись в следующих концентрациях: LPS 100 нг/мл, R848 2,85 мкМ, ODN1668 1 мкМ и PIC 50 мкг/мл.

з – влияние пептидов на PIC-индуцированное фосфорилирование транскрипционного фактора STAT-1.

4.2.2.2 Скрининг пептидных библиотек TIR доменов TLR1 и TLR6

TLR 1 и TLR6 не способны индуцировать сигнал самостоятельно, они оказывают своё действие гетеродимеризовавшись с TLR2 (Ozinsky et al., 2000; Takeuchi et al., 2001). Дизайн пептидных библиотек TLR1 и TLR6 был аналогичен описанным выше библиотекам, представляющим TIR домены TLR4 и TLR2. Пептиды библиотек обозначались как 1Rx, где первое число обозначает TLR, на основании которого создана библиотека, а x число от 1 до 11, обозначающее структурный участок TIR домена, соответствующий пептиду (Таблица 1). Вследствие высокой степени гомологии TLR1 и TLR6, некоторые участки TIR доменов этих рецепторов идентичны. Пептиды, происходящие из участков идентичных в TLR1 и TLR6, обозначались 16Rx (Piao et al., 2016). Последовательности использовавшихся пептидов приведены в таблице 1. Результаты скрининга пептидных библиотек TIR доменов TLR1 и TLR6 представлены на рисунке 18.

Использовались 4 типа тестов для оценки эффективности ингибирования: экспрессия *Tnf* через 1 час после стимуляции (Рис. 18а и д), экспрессия *Il-6* через 4 часа после стимуляции (Рис. 18б и е), а также секреция TNF и IL-6, оцененная по их содержанию в 5-ти часовых супернатантах макрофагов (Рис 18в, г, ж, з). Клетки стимулировали Р3С в дозе 500 нг/мл (Рис. 18, панели а-г) или Р2С в дозе 50 нг/мл (Рис. 18, панели д-з). Эксперименты идентифицировали 2 обладающих ингибиторной активностью пептида в каждой из библиотек. Примечательно, что ингибиторные пептиды происходили из структурно гомологичных регионов TIR доменов. Так, в обеих библиотеках пептиды, соответствующие 4-й α -спирали (регион 9), пептиды 1R9 и 6R9, оказывали выраженное ингибиторное действие (Рис. 18). Аналогично, пептиды 1R10 и 6R10 (эти пептиды включают в себя краевой тяж β -листа вместе с прилегающими петлями соответствующих TIR доменов (Табл. 1)) ингибировали как экспрессию цитокиновой мРНК, так и продукцию цитокинов макрофагами (Рис. 18).

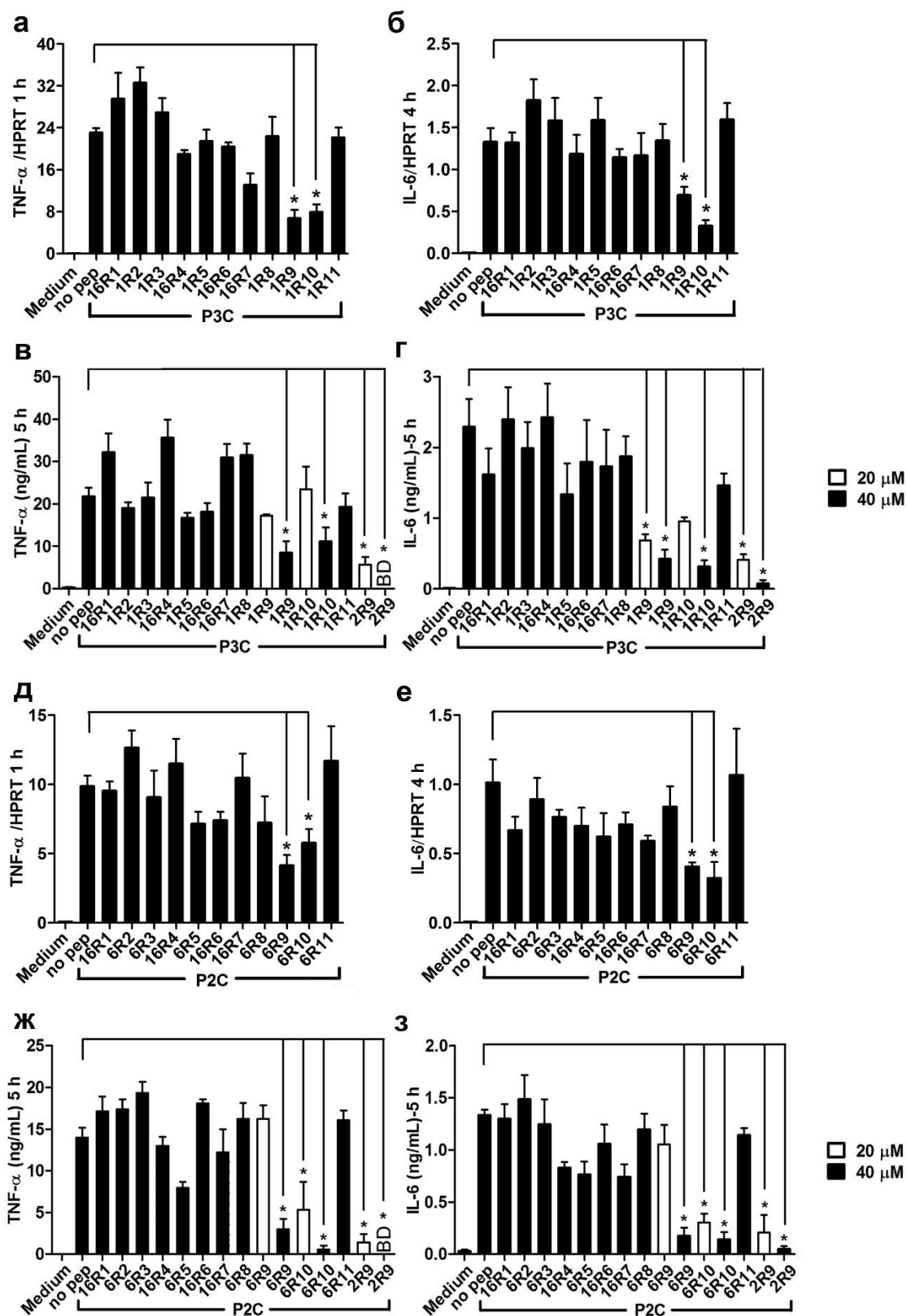


Рисунок 18 — Скрининг ингибиторных пептидов, происходящих из TIR доменов TLR1 и TLR6 (Piao et al., 2016)

а, б – влияние пептидов на P3C-индуцированную экспрессию *Tnf* (**а**) и *Il-6* (**б**). Перитонеальные макрофаги мышей линии C57BL/6J были инкубированы в течение 30 мин в присутствии 40 μ M пептидов. Пробы РНК отбирались через 1 час после стимуляции. Экспрессия цитокинов оценивалась методом ОТ-ПЦР и нормализовалась на экспрессию *Hprt*. P3C использовался в концентрации 500 нг/мл.

в, г – влияние пептидов на P3C-индуцированную секрецию TNF (**в**) и IL-6 (**г**). Перитонеальные макрофаги инкубировали в течение 30 мин в присутствии 20 (белые колонки) или 40 μ M (черные колонки) пептидов перед стимуляцией TLR2. Содержание цитокинов в супернатантах оценивалось через 5 часов после добавки P3C в конечной концентрации 500 нг/мл.

д, е – влияние пептидов на P2C-индуцированную экспрессию *Tnf* (**а**) и *Il-6* (**б**). Перитонеальные макрофаги мышей линии C57BL/6J были инкубированы в течение 30 мин в присутствии 40 μ M пептидов. Пробы РНК отбирались через 1 час после стимуляции. Экспрессия цитокинов оценивалась методом ОТ-ПЦР и нормализовалась на экспрессию *Hprt*. P2C использовался в концентрации 50 нг/мл.

ж, з – влияние пептидов на P2C-индуцированную секрецию TNF (**ж**) и IL-6 (**з**) перитонеальными макрофагами. Содержание цитокинов в супернатантах оценивалось через 5 часов после добавки P2C в конечной концентрации 50 нг/мл.

Сравнение эффективности ингибирования продукции цитокинов пептидами различных библиотек показало, что описанный выше ингибиторный пептид библиотеки TLR2, пептид 2R9, оказывал более выраженный эффект на секрецию TNF и IL-6 в сравнении с пептидами библиотек TLR1 и TLR6 при стимуляции клеток как P3C, так и P2C (Рис. 18, панели **в, г, ж и з**).

В следующей серии экспериментов изучалась специфичность влияния ингибиторных пептидов библиотек TLR1 и TLR6 на различные сигнальные пути. Эксперименты показали, что пептиды библиотеки TLR1 не блокировали сигнал, индуцированный с участием TLR6 (Рис. 19а), а пептиды библиотеки TLR6 не блокировали TLR1 (Рис. 19б), тогда как описанный выше пептид 2R9 библиотеки TLR2, блокировал сигнал обоими

гетеродимерами (Рис. 19а и б). Пептиды, соответствующие α -спиралям D TLR1 и TLR6 (пептиды 1R9 и 6R9), не блокировали индукцию TNF агонистами TLR4 и TLR9 (Рис. 19г и д), тогда как пептиды обеих библиотек, включающие β -тяж Е, ингибировали сигналы, индуцированные TLR4 и TLR9 (Рис. 19г и д). Ни один из пептидов исследуемой серии не ингибировал TNF-индуцированную экспрессию TNF (Рис. 19е).

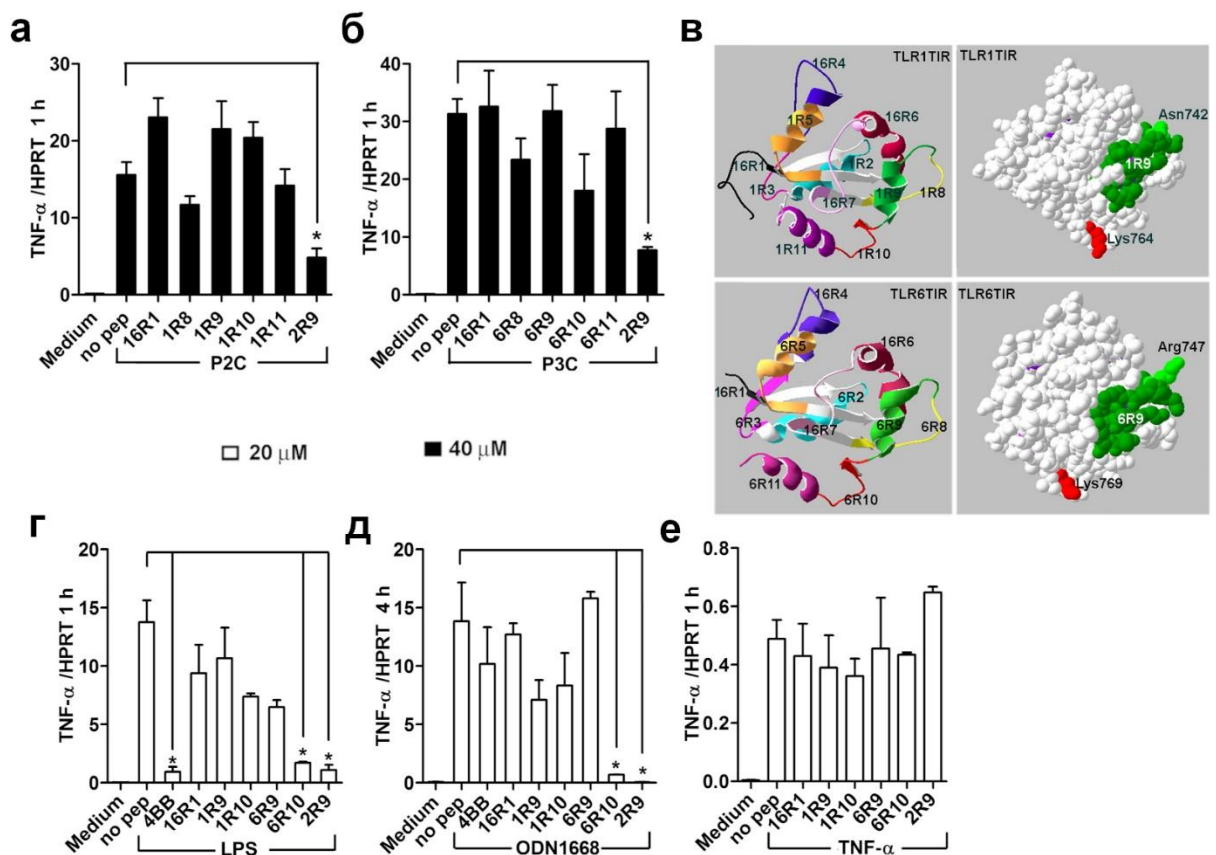


Рисунок 19 — Специфичность действия ингибиторных пептидов библиотек TLR1 и TLR6 (Piao et al., 2016)

а – пептиды библиотеки TLR1 не блокируют экспрессию *Tnf*, индуцированную активацией TLR2/TLR6 гетеродимера. Перитонеальные макрофаги мышей линии C57BL/6J инкубировались в течение 30 мин в присутствии 40 μ M пептидов и стимулировались P2C в концентрации 50 нг/мл. Пробы РНК отбирались через 1 час после стимуляции.

б – пептиды библиотеки TLR6 не блокируют экспрессию *Tnf*, индуцированную активацией TLR2/TLR1 гетеродимера. Перитонеальные макрофаги мышей линии

C57BL/6J инкубировались в течение 30 мин в присутствии 40 μ M пептидов и стимулировались P2C в концентрации 500 нг/мл. Пробы РНК отбирались через 1 час после стимуляции.

в – структурные модели TIR доменов TLR1 (верхние модели) и TLR6 (нижние модели), показывающие сегменты последовательности (левые модели) и сегменты поверхности, представляемые пептидами 1R9 и 6R9 (правые модели).

г–е – специфичность действия ингибиторных пептидов библиотек TLR1 и TLR6 в отношении экспрессии *Tnf*, индуцированной LPS 100 нг/мл (**г**), ODN1668 3 мкМ (**д**), или TNF 5 нг/мл (**е**). Пептиды 4BB и 2R9 использовались в качестве дополнительных контролей. Эксперименты выполнены на перитонеальных макрофагах мышей линии C57BL/6J.

4.2.2.3 Скрининг пептидной библиотеки TIR домена TLR9

В отличие от экспрессирующихся на плазматической мембране клеток TLR1, TLR2, TLR4 и TLR5, рецепторы TLR9, TLR3, TLR7 и TLR8 экспрессируются на эндосомальных мембранах (Kawai et al., 2024). Эндосомально экспрессирующиеся TLR распознают присутствие микробных нуклеиновых кислот, что отличает их от рецепторов, экспрессирующихся на плазматической мембране, которые активируются микробными липидами, липопептидами или белками. В частности, TLR9 активируется неметилованной бактериальной или вирусной ДНК, содержащей CpG мотивы (Bauer et al., 2001; Hemmi et al., 2000).

С целью обнаружения блокирующих пептидов, специфически подавляющих функцию TLR9, была создана и проскринирована библиотека пептидов, представляющих TIR домен TLR9 (Рис. 20а и б). Последовательности использовавшихся пептидов показаны в таблице 1. В скрининге определялась способность отдельных пептидов подавлять экспрессию цитокинов макрофагами, дифференцированными в культуре из

клеток костного мозга мышей (КММ) (Рис. 20в). Для активации TLR9 использовали синтетический олигонуклеотид ODN1668.

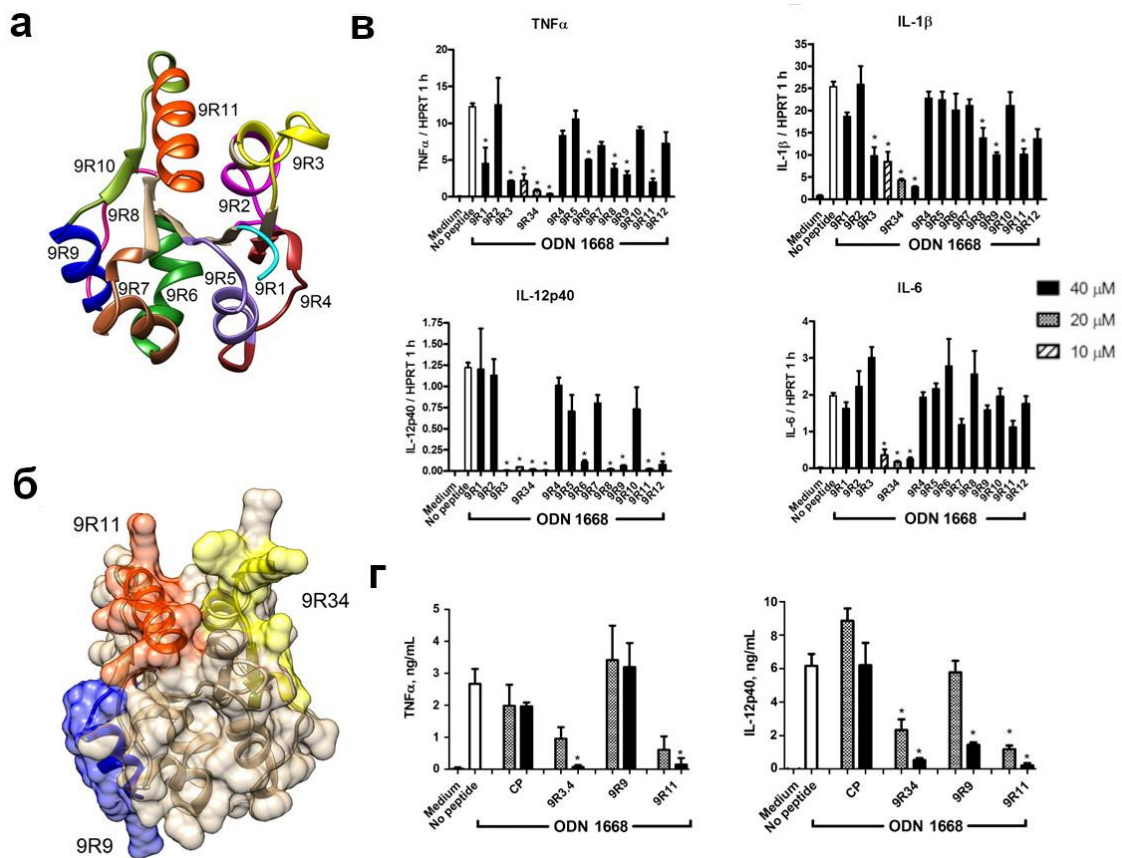


Рисунок 20 — Влияние ингибиторных пептидов, происходящих из TIR домена TLR9, на экспрессию (в) и секрецию (г) цитокинов, индуцированную иммуностимулирующим олигонуклеотидом ODN1668 (Javmen et al., 2018)

а, б – структурные модели TIR домена TLR9, показывающие укладку пептидной цепи (**а**) и поверхность домена (**б**). Сегменты цепи, соответствующие отдельным пептидам, показаны различными цветами.

в – влияние пептидов на экспрессию цитокинов, индуцированную олигонуклеотидом ODN1668. КММ мышей линии C57BL/6J инкубировались в течение 30 мин в присутствии указанных концентраций пептидов и стимулировались ODN1668 в конечной концентрации 1 мкМ. Пробы РНК отбирались через 1 час после стимуляции. Экспрессия цитокинов оценивалась методом ОТ-ПЦР и нормализовалась на экспрессию *Hprt*.

Представлены средние значения и стандартная ошибка трех независимых экспериментов. Достоверность различий средних оценивалась однофакторным дисперсионным анализом (one-way ANOVA). Достоверными считались отличия с $p < 0.01$.

г – влияние пептидов на секрецию TNF и IL-12p40 макрофагами костного мозга, стимулированными ODN1668. КММ обрабатывали пептидами и стимулировали как описано выше. Супернатанты для определения содержания цитокинов отбирали через 5 часов после стимуляции клеток.

Скрининг библиотеки показал, что наиболее выраженным ингибиторным действием в отношении ODN1668-индуцированной экспрессии цитокинов обладал пептид 9R34 (Рис. 20в). Этот пептид включал в себя один из краевых тяжей β -листа, тяж В, вместе с участками прилегающих петель АВ и ВВ (Табл. 1). Выраженное ингибиторное действие пептида 9R34 отмечалось в отношении экспрессии всех тестируемых цитокинов, причём статистически достоверный эффект наблюдался во всём диапазоне исследованных концентраций пептида (10–40 мкМ) (Рис. 20в). Помимо 9R34, несколько других пептидов подавляли активацию экспрессии цитокинов. Так, пептид 9R3 (этот пептид частично перекрывается с 9R34 (Табл. 1)), пептид 9R11, а также представляющие последовательные сегменты цепи пептиды 9R8 и 9R9 заметно подавляли экспрессию TNF, IL-1 β и IL-12p40 (Рис. 20в).

Ингибиторные пептиды 9R34, 9R9 и 9R11 были дополнительно протестированы на способность подавлять ODN-индуцированную секрецию TNF и IL-12p40. Полученные результаты подтвердили наблюдения, сделанные на уровне экспрессии цитокиновой мРНК. Пептиды 9R34 и 9R11 эффективно подавляли секрецию обоих цитокинов, тогда как пептид 9R9 ингибировал менее эффективно (Рис. 20г). Статистически достоверное снижение секреции пептидом 9R9

наблюдалось только в отношении IL-12p40 и только в присутствии большей из использовавшихся концентраций (Рис. 20г).

С целью оценки селективности действия пептидов 9R34 и 9R11 изучалось их влияние на экспрессию *Tnf*, индуцированную агонистами TLR2, TLR7 и TLR4 (P3C, R848 и LPS, соответственно). Пептиды не оказывали влияния на активацию TLR2 и TLR7, однако можно было отметить слабое (по сравнению с эффектом на ODN1668-индуцированную экспрессию) подавление LPS-стимулированной экспрессии *Tnf* пептидом 9R34 (Рис 21а). Проверка влияния пептида 9R34 на секрецию цитокинов, однако, показала, что подавление экспрессии *Tnf* в присутствии пептида, по-видимому, временное, поскольку не наблюдалось достоверного эффекта этого пептида на секрецию TNF (Рис. 21б).

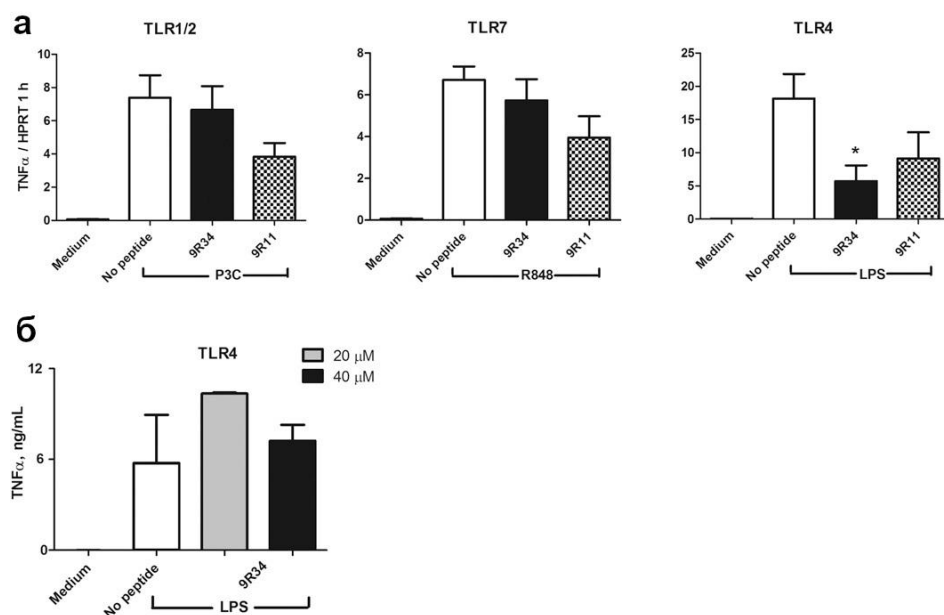


Рисунок 21 — Специфичность действия ингибиторных пептидов библиотеки TIR домена TLR9 (Javmen et al., 2018)

а – влияние ингибиторных пептидов библиотеки TLR9 на экспрессию *Tnf*, индуцированную активацией TLR2, TLR7 и TLR4. КММ мышей линии C57BL/6J инкубировались в течение 30 мин в присутствии 40 μ M пептидов и стимулировались P3C

в концентрации 500 нг/мл, R848 (2,85 мкМ) или LPS (100 нг/мл). Пробы РНК отбирались через 1 час после стимуляции.

б – влияние пептида 9R34 на LPS-индуцированную секрецию TNF. Клетки стимулировались как описано выше. Пробы супернатанта для определения содержания TNF отбирались через 5 часов после стимуляции. На графиках показаны средние и стандартные ошибки средних по результатам 3-х независимых экспериментов.

В следующей серии экспериментов было детально изучено влияние аминокислотных замен на ингибиторную эффективность пептида 9R34. Было синтезировано 5 модификаций пептида 9R34: 9R34-ΔN (в этом пептиде отсутствовали 3 N-концевых аминокислотных остатка блокирующей части пептида 9R34), пептид 9R34-ΔC (отличается от 9R34 отсутствием 3-х C-концевых аминокислотных остатков), 9R34-C/S (центральный цистеин заменён на серин), а также 9R34-ΔL1 и 9R34-ΔL2, в которых один или 2 центральных лейцина заменены на аланины (Табл. 1).

Оценка влияния модифицированных пептидов на экспрессию цитокинов через час после стимуляции МКК олигонуклеотидом ODN1668 показала, что ни делеция N- или C-конца блокирующей части пептида, ни замена центрального цистеина на серин не оказывали существенного влияния на ингибиторную активность пептида (Рис. 22). Наиболее выраженное снижение эффективности ингибирования наблюдалось при замене лейцинов, прилегающих к центральному цистеину (Рис. 22). Можно отметить, что наблюдаемый паттерн ингибиторной активности не противоречит моделям, полагающим, что в димеризации TIR доменов рецепторов и в их взаимодействии с TIR доменами адаптерных белков участвуют краевые тяжи β-листа (Clabbers et al., 2021; Javmen et al., 2018; Ve et al., 2017).

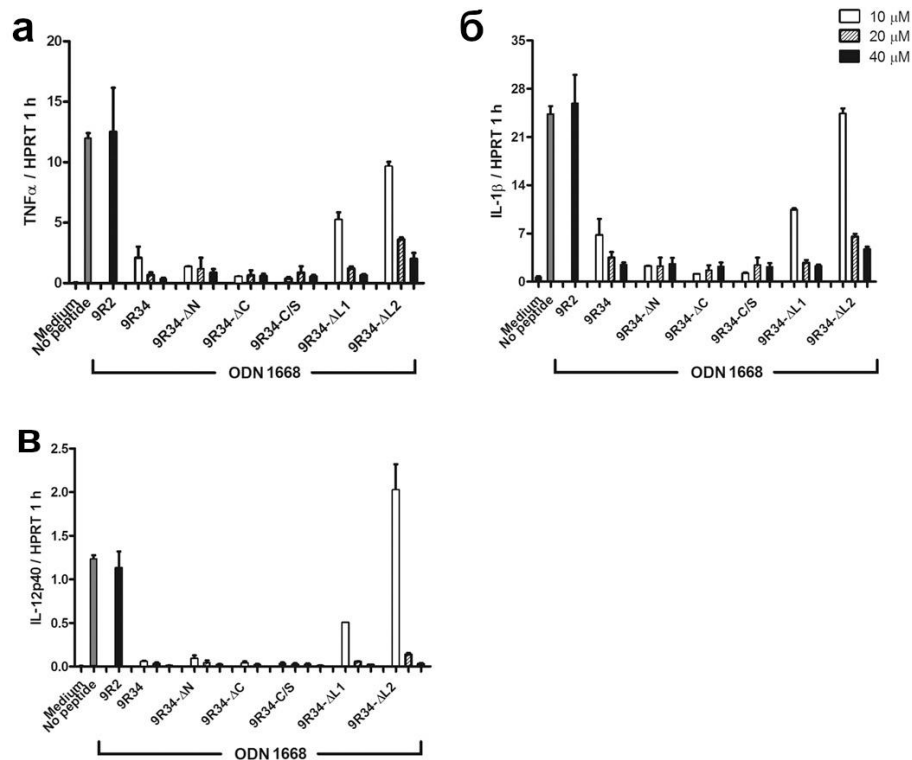


Рисунок 22 — Влияние аминокислотных замен на ингибиторную активность пептида 9R34 (Javmen et al., 2018)

а–с – влияние модификаций пептида 9R34 на экспрессию *Tnf* (**а**), *Il-1 β* (**б**), и *Il-12p40*, индуцированную олигонуклеотидом ODN1668. МКК мышей линии C57BL/6J инкубировались в течение 30 мин в присутствии указанных концентраций пептидов и стимулировались ODN1668 в концентрации 1 мкМ. Пробы РНК отбирались через 1 час после стимуляции.

4.2.2.4 Скрининг пептидной библиотеки TIR домена TLR7

Природным активатором TLR7 является одноцепочечная вирусная РНК (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Lund et al., 2004). TLR7 и TLR8 также могут быть активированы производными имидазохинолина, одним из которых является резихимод, часто обозначаемый в литературе как R848 (Bauer et al., 2008; Hemmi et al., 2002). Библиотека блокирующих пептидов

TIR домена TLR7 была синтезирована аналогично другим описанным выше пептидным библиотекам на основе последовательностей TIR доменов. Первичная оценка способности пептидов ингибировать TLR7 производилась по их влиянию на индуцированную резихимодом продукцию цитокинов. К пептидам библиотеки TLR7 был добавлен пептид 2R9 в качестве контрольного ингибиторного пептида, способного ингибировать TLR7 (Piao et al., 2015). Результаты скрининга показаны на рисунке 23.

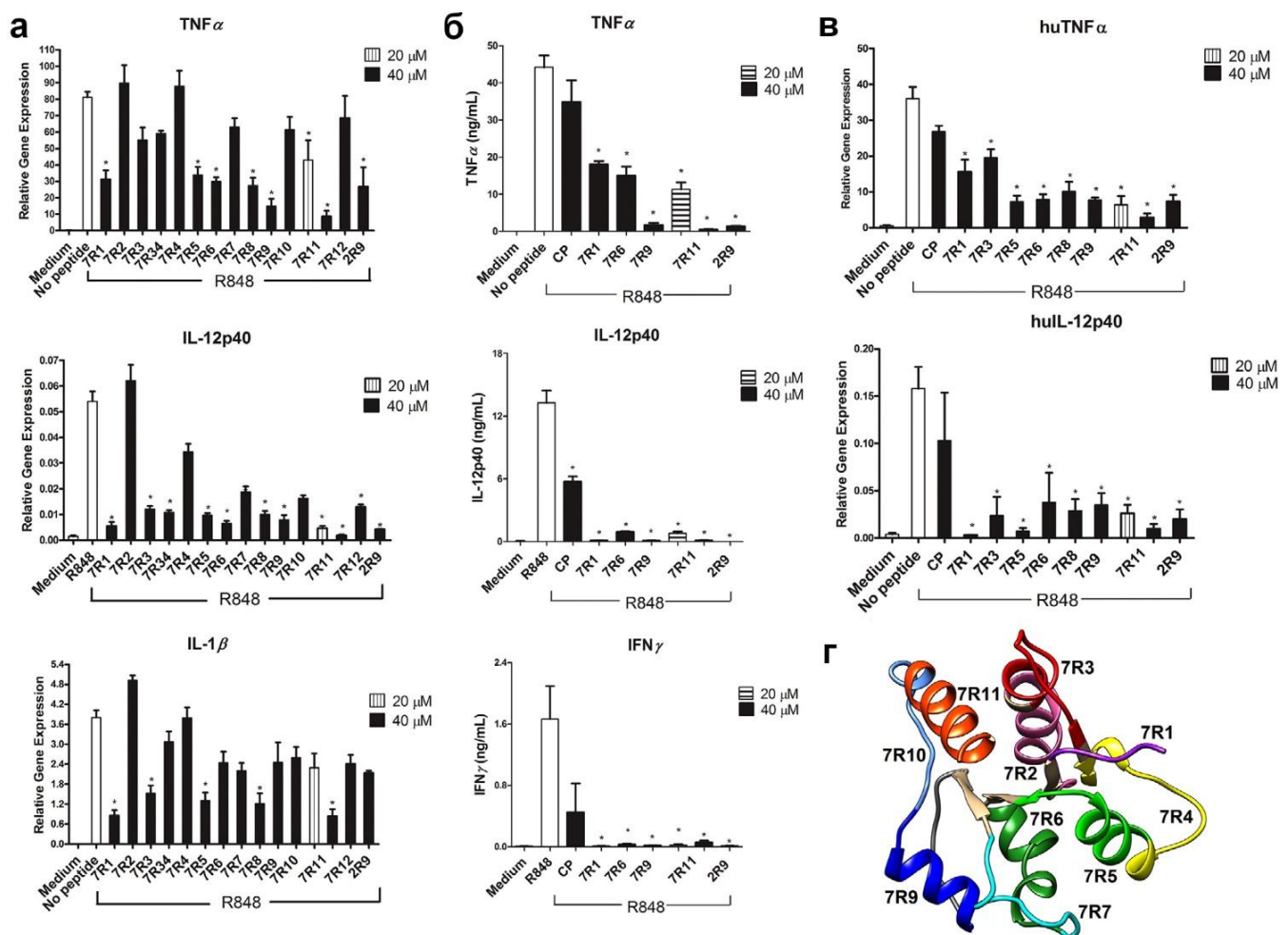


Рисунок 23 — Влияние пептидов, происходящих из TIR домена TLR7, на индуцированную резихимодом (R848) экспрессию (а, в) и секрецию (б) цитокинов перитонеальными макрофагами мышей (а, б) и клетками человеческой моноцитарной линии THP-1 (в) (Javmen et al., 2020)

а – влияние пептидов на экспрессию *TNF*, *IL-12p40* и *IL-1 β* перитонеальными макрофагами, стимулированными R848. Клетки инкубировали в присутствии пептидов 30 мин и стимулировали R848 (285 нМ). Лизаты для выделения мРНК получали через 1 час после стимуляции. Представлены средние значения и стандартная ошибка для трех независимых экспериментов. Достоверность различий оценивалась однофакторным дисперсионным анализом (one-way ANOVA). Звездочкой отмечены отличия от контроля (агонист в отсутствие пептида) с $p < 0.001$.

б – влияние пептидов на секрецию *TNF*, *IL-12p40* и *IFN- γ* перитонеальными макрофагами, стимулированными R848. Клетки инкубировали в присутствии пептидов и стимулировали, как описано выше. Супернатанты для определения содержания цитокинов отбирали через 24 часа после стимуляции клеток.

в – влияние пептидов на экспрессию *TNF* и *IL-12p40* клетками моноцитарной человеческой линии THP-1. Клетки инкубировали в присутствии пептидов 30 мин и стимулировали R848 (28,5 мкМ). Пробы РНК отбирались через 1 час после стимуляции.

г – структурная модель TIR домена TLR7, показывающая укладку и сегменты цепи, соответствующие отдельным пептидам.

Пептиды 7R1, 7R3, 7R5, 7R6, 7R8, 7R9, 7R11 и 2R9 понижали экспрессию мРНК цитокинов, активированную R848 (Рис. 23а). Наиболее выраженным действием в отношении экспрессии *TNF* обладал пептид 7R11, соответствующий 5-й α -спирали TIR домена TLR7 (Рис. 23а, г). Проверка влияния пептидов на количество секретируемых цитокинов в 24-часовых супернатантах показало, что пептид 7R11, а также пептиды 7R9 и 2R9 оказывали долгосрочное ингибиторное действие на R848-индуцированную продукцию цитокинов перитонеальными макрофагами мышей (Рис. 23б). Пептиды также были проверены на способность блокировать продукцию цитокинов в клетках моноцитарной клеточной линии человека THP-1. Пептид 7R11 и другие ингибиторные пептиды, идентифицированные в мышинных клетках, подавляли продукцию цитокинов со сравнимой эффективностью и в клетках человека (Рис. 23в).

Тестирование специфичности действия ингибиторных пептидов библиотеки TLR7 в отношении функции TLR4, TLR9, TLR2/1 и TLR2/6 показало, что пептиды мультиспецифичны в отношении различных TLR — пептиды 7R11, 7R9 и, в несколько меньшей степени, пептиды 7R6 и 7R1, подавляли TLR-зависимую экспрессию *Tnf* (Рис. 24а-г). Указанные пептиды также эффективно подавляли экспрессию *Tnf*, индуцированную активаторами TLR7 нуклеотидной природы — одноцепочечными РНК ssRNA40 и ssRNA-polyU (Рис. 24д, е) (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Lund et al., 2004).

Была протестирована ингибиторная активность трёх модификаций пептида 7R11 — пептидов 7R11-ΔN и 7R11-ΔC, в которых 4 концевых аминокислотных остатка блокирующей части были удалены соответственно с N и C конца, а также пептида 7R11-C/S, в котором центральный цистеин был заменён на серин (Табл. 1). Все 3 протестированные модификации снижали биологическую активность пептида 7R11 (Рис. 25).

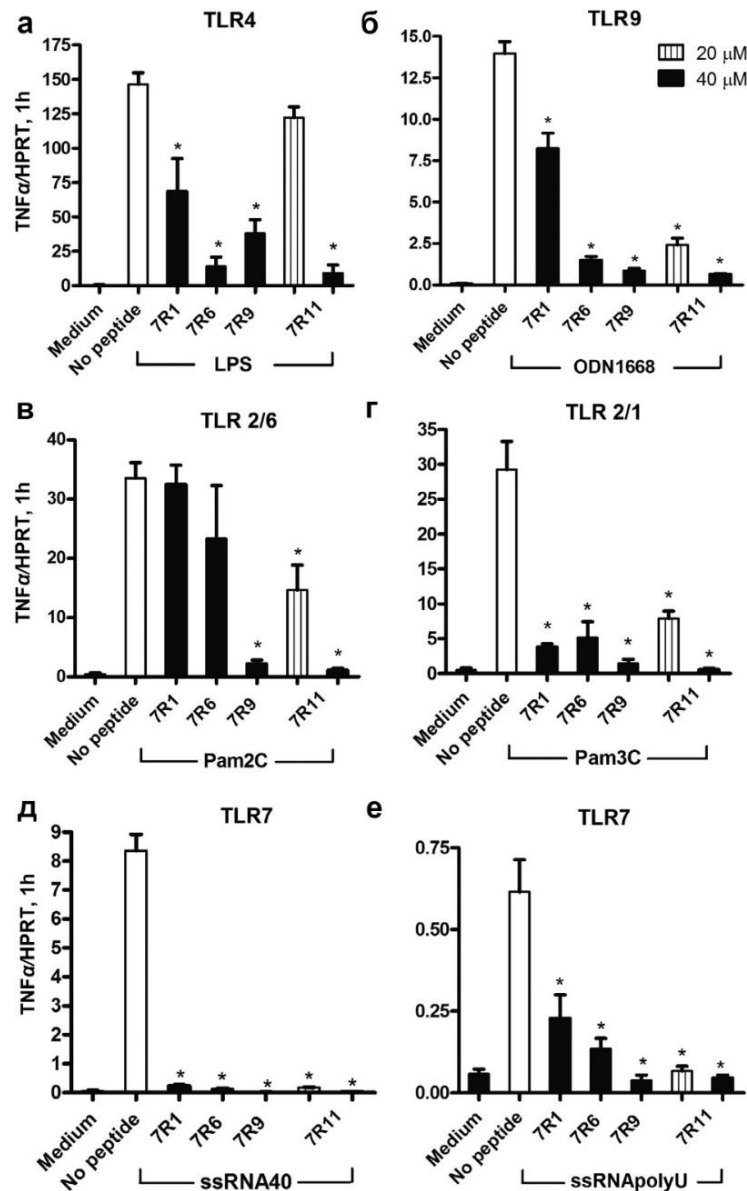


Рисунок 24 — Влияние ингибиторных пептидов библиотеки TIR домена TLR7 на экспрессию *Tnf*, индуцированную (а) LPS (100 нг/мл), (б) ODN1668 (1 мкМ), (в) Pam2Cys (39 нМ), (г) Pam3Cys (330 нМ), одноцепочечной РНК ssRNA40 (д) или одноцепочечной полиуридиновой РНК (е) (Javmen et al., 2020)

Экспрессия *Tnf* измерялась через час после стимуляции клеток. РНК в комплексе с катионным липидом LyoVec™ использовалась в концентрации 5 мкг/мл. Эксперименты проводились на перитонеальных макрофагах (а, в-е) либо макрофагах, дифференцированных из костного мозга мышей (б).

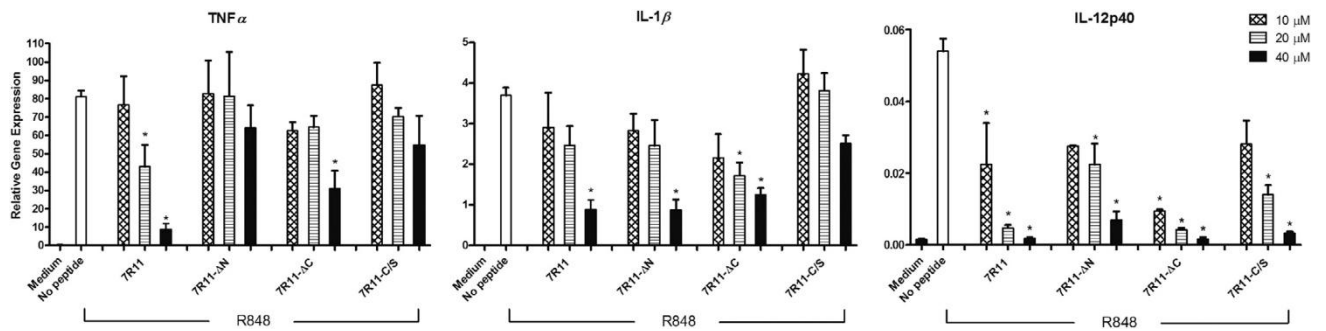


Рисунок 25 — Влияние модификаций пептида 7R11 на его ингибиторную активность (Javmen et al., 2020)

Влияние пептидов на экспрессию *TNF*, *IL-1β* и *IL-12p40* перитонеальными макрофагами, стимулированными R848. Клетки инкубировали в культуральной среде в присутствии пептидов 30 мин и стимулировали R848 (0,285 мкМ). Лизаты для выделения мРНК получали через 1 час после стимуляции.

4.2.2.5 Скрининг пептидной библиотеки, представляющей TIR домен TLR5

TLR5 активируется белком флагеллином, являющимся основным структурным элементом бактериальных жгутиков (Gewirtz et al., 2001; Hayashi et al., 2001). Такая специфичность обуславливает важную роль TLR5 в распознавании филогенетически широкой группы мотильных патогенов. Первичный скрининг пептидов библиотеки, представляющей TIR домен TLR5, был проведен в репортерной линии клеток HEK-Blue™-mTLR5 (InVivoGen, США), представляющей собой клетки линии HEK293, стабильно трансфицированные мышинным TLR5 и репортерным белком – секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазой (SEAP) под контролем минимального *Ifn-β* промотора, дополненного пятью сайтами связывания транскрипционных факторов NF-κB и AP-1. Первичный скрининг библиотеки TLR5 (последовательности пептидов представлены в

таблице 1) показал, что пептиды 5R6, 5R7 и 5R11 подавляли стимулированную флагеллином экспрессию репортерного гена (Рис. 26б).

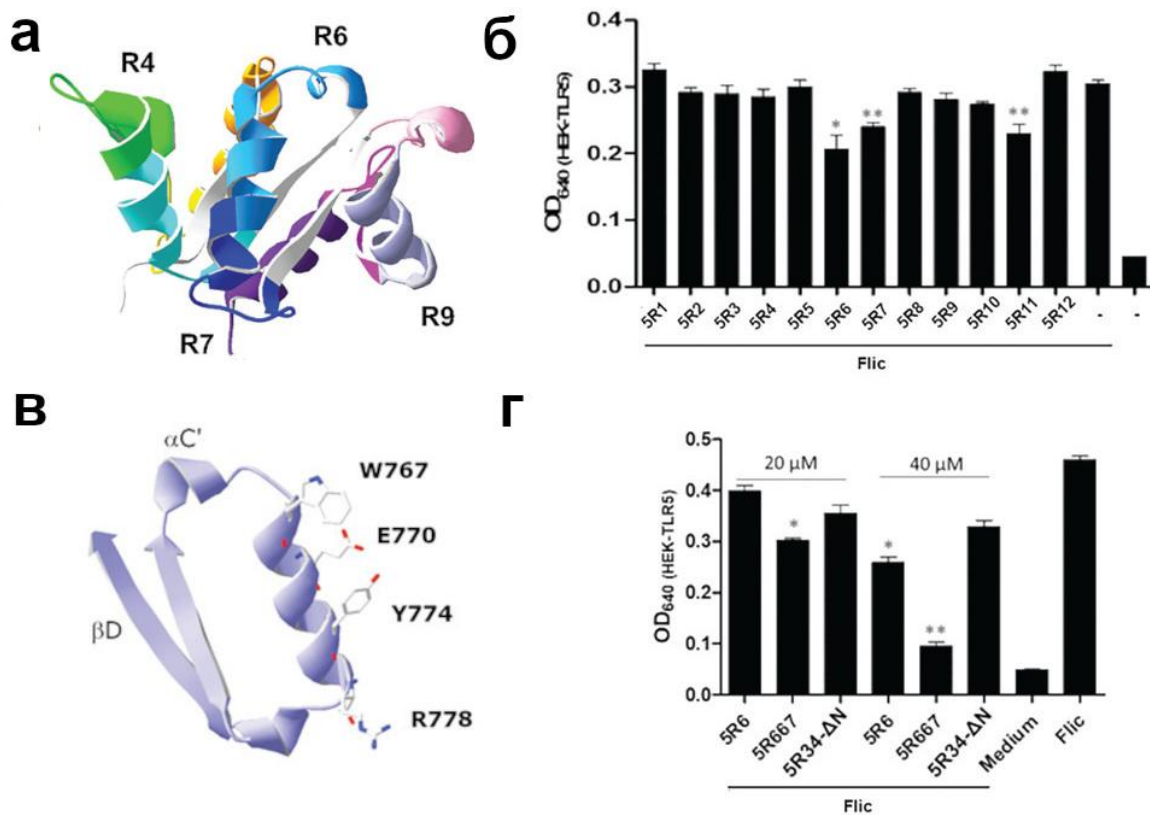


Рисунок 26 — Влияние пептидов, происходящих из TIR домена TLR5, на функцию TLR5 (Javmen et al., 2023)

а – структурная модель TLR5, показывающая сегменты последовательности, представленные пептидами библиотеки.

б – влияние пептидов на экспрессию репортерного гена SEAP. Клетки репортерной линии HEK-Blue™-mTLR5 (InVivoGen, США) инкубировали в присутствии 40 мкМ пептидов в течении 30 минут и стимулировали флагеллином (Flic) в конечной концентрации 3,125 нг/мл. Супернатанты для определения содержания репортерного белка отбирали через 16 часов после стимуляции клеток.

в – структурная модель, показывающая третий спиральный участок TIR домена TLR5. Боковые цепи показаны для эволюционно сохранных аминокислотных остатков, экспонированных на поверхности домена (Javmen et al., 2023; Toshchakov & Neuwald, 2020).

г – ингибиторная активность модифицированных пептидов исходной библиотеки в отношении экспрессии репортерного гена клетками HEK-Blue™-mTLR5. Клетки

инкубировали в присутствии пептидов 30 мин и стимулировали флагеллином (10 нг/мл). Супернатанты для определения содержания репортерного белка отбирали через 5 часов после стимуляции клеток. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Поскольку пептиды 5R6 и 5R7 включали в себя последовательные участки первичной последовательности TLR5, представляющие соприкасающиеся сегменты поверхности TIR домена, были синтезированы дополнительные пептиды, включающие в себя С-концевые аминокислотные остатки пептида 5R6, сопряженные с N-концевыми остатками блокирующей части пептида 5R7 (Табл. 1, Рис. 26в). Полученные пептиды были протестированы в репортерной линии (Рис. 26в), а также в мышинных макрофагах (Рис. 27). Проведенное тестирование показало, что пептид 5R667, представляющий спираль С'' третьего спирального участка TIR домена, в целом обладал наиболее выраженными ингибиторными свойствами (Рис. 26г и 27), тогда как активность пептида 5R67, не включающего в себя N-концевой триптофан α -спирали С'' (Рис. 26г, Табл. 1), была существенно ниже (Рис. 27).

С целью характеристики специфичности действия пептидов было изучено влияние пептидов, происходящих из третьего спирального участка TIR домена TLR5 (5R6, 5R67 и 5R667) (Рис. 26а и в, Табл. 1), а также пептидов, соответствующих структурно гомологичным участкам TIR домена адаптерного белка TIRAP (пептиды TR6, TR67 и TR667) (Табл. 1), на экспрессию цитокинов, индуцированную различными лигандами TLR. Сравнивалось количество цитокиновой мРНК через 1 час после стимуляции перитонеальных или костномозговых макрофагов флагеллином, LPS, R848 и РЗС (Рис. 27). Отметим, что пептид TR667 соответствовал известному сайту взаимодействия белка TIRAP, осуществляющему взаимодействие TIRAP как с активированным рецептором, так и адаптер-адаптерные

взаимодействия (Javmen et al., 2018; Ve et al., 2017). В качестве контрольного ингибирующего пептида использовался пептид библиотеки TLR2 (2R9), который, как было показано ранее, является мультиспецифичным ингибитором TLR, способным эффективно ингибировать TLR2, TLR4, TLR7 и TLR9 (Piao et al., 2015). Пептиды добавляли к клеткам за 30 минут до стимуляции TLR.

Полученные данные показали, что все испытанные модификации пептидов 5R6 и TR6 оказывали выраженное ингибиторное действие на экспрессию *Tnf* и *Il-1 β* , стимулированную агонистами TLR4 и TLR2/1 (LPS и P3C), но не агонистом TLR7 резихимодом (Рис. 27а, б). Аналогичный эффект наблюдался и в отношении цитокина KC, однако ингибирование P3C-стимулированной экспрессии не было статистически значимым (Рис. 27г). В отличие от экспрессии TNF, IL-1 β и KC, R848-индуцированная экспрессия IL-12p40 подавлялась пептидами (Рис. 27г). Более высокая чувствительность экспрессии IL-12p40 к ингибированию пептидами объяснялась замедленной индукцией этого цитокина по сравнению с экспрессией TNF, IL-1 β и KC, что указывает на ген-специфические отличия механизмов индукции этого цитокина.

Влияние пептидов на экспрессию цитокинов, индуцированную активацией TLR9, тестировалось на макрофагах костного мозга, поскольку эти клетки характеризуются более сильным ответом на стимуляцию TLR9 (Javmen et al., 2018). Все протестированные пептиды библиотеки TLR5 подавляли TLR9-зависимую экспрессию цитокинов (Рис. 27д). Полученные данные также подтвердили, что пептид 5R667 оказывал наиболее выраженное действие (Рис. 27).

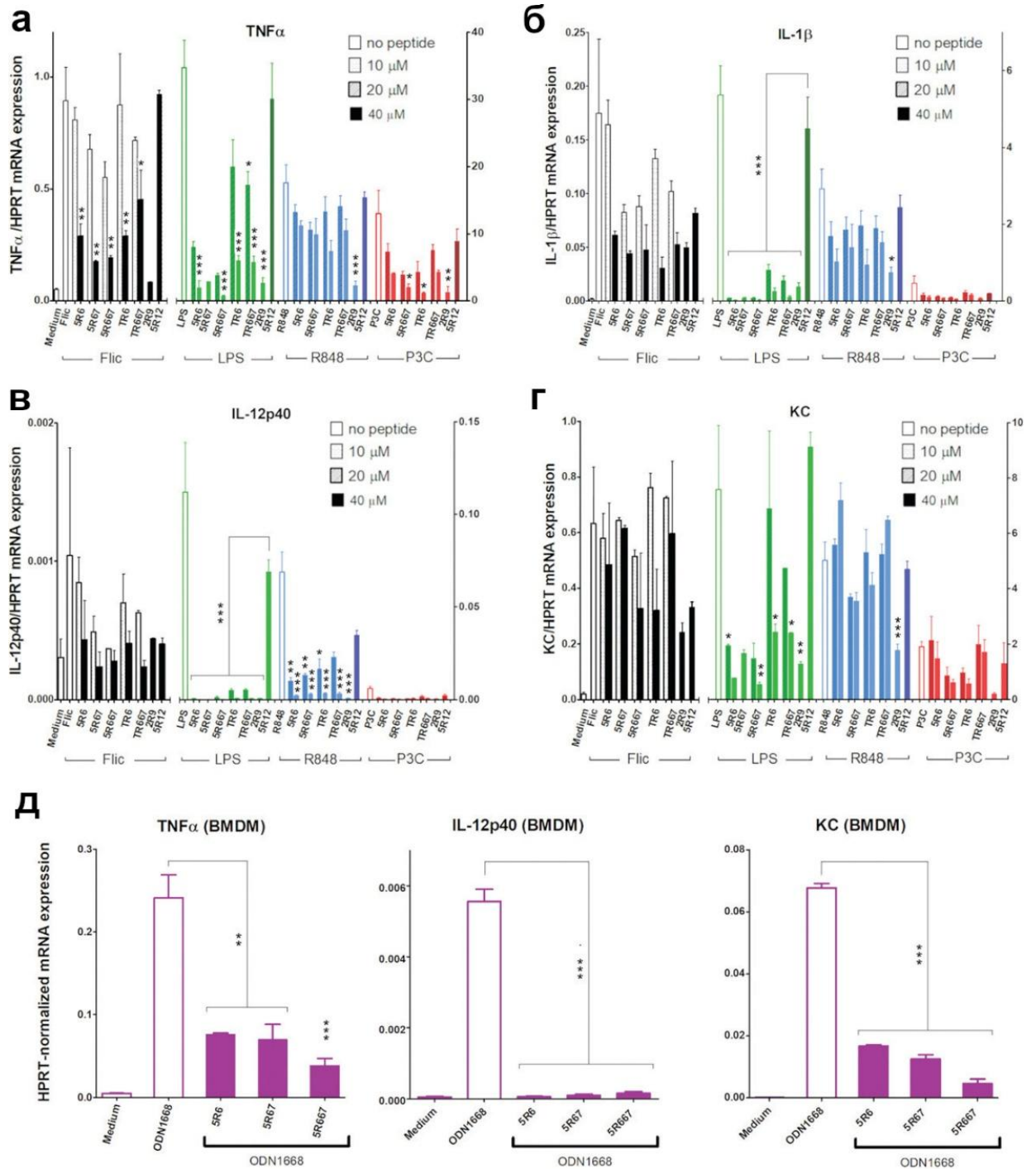


Рисунок 27 — Специфичность ингибиторного действия пептидов, происходящих из TIR домена TLR5, на индукцию TNF (а, д), IL-1 β (б), IL-12p40 (в, д) и KC (г, д) различными TLR в перитонеальных макрофагах (а–г) и дифференцированных макрофагах костного мозга (д) (Javmen et al., 2023)

Макрофаги инкубировали в присутствии указанных концентраций блокирующих пептидов в течение 30 минут и стимулировали флагеллином (Flic) (10 нг/мл), LPS (100 мкг/мл), R848 (5 мкМ), P3C (500 нг/мл) или ODN1668 (1 мкМ). Экспрессия цитокинов измерялась через час после стимуляции клеток агонистами TLR. В панелях **а–г** уровни флагеллин-индуцированной экспрессии цитокинов показаны на левой оси Y, тогда как уровни экспрессии цитокинов макрофагами, стимулированными LPS, R848 или P3C, показаны на правой шкале.

Экспрессия IL-6 синергически регулируется большим количеством транскрипционных факторов, что проявляется в замедленной индукции этого цитокина при активации TLR (Faggioli et al., 2004). С целью изучения долгосрочного влияния пептидов на функцию TLR изучалось их влияние на LPS-стимулированную экспрессию IL-6 в течение первых 5-ти часов после стимуляции. Как и ожидалось, экспрессия IL-6 существенно возрастала в период наблюдения (Рис. 28а). Все протестированные блокирующие пептиды оказывали выраженное ингибирующее действие на экспрессию IL-6 на протяжении всего периода наблюдения (Рис. 28а и б). Можно отметить, что экспрессия IL-6 после обработки клеток ингибиторными пептидами, включая 5R667, составляла менее 1% от таковой в отсутствие пептидов (Рис. 28а и б).

Пептиды 5R667 и TR667 также полностью блокировали LPS-индуцированное фосфорилирование МАП киназы ERK1/2, а также фосфорилирование NF-κB-активирующей киназы IKKα/β (Рис. 28в). Отметим, что ингибирование фосфорилирования ERK1/2 было селективно по отношению к активации МАП киназ, индуцированной LPS, но не резихимодом (Рис. 28в). Последнее наблюдение согласуется с отсутствием достоверного влияния пептидов третьего спирального участка TIR доменов TLR5 и TIRAP на индуцированную резихимодом экспрессию TNF, IL-1β и KC (Рис. 27а, б, г).

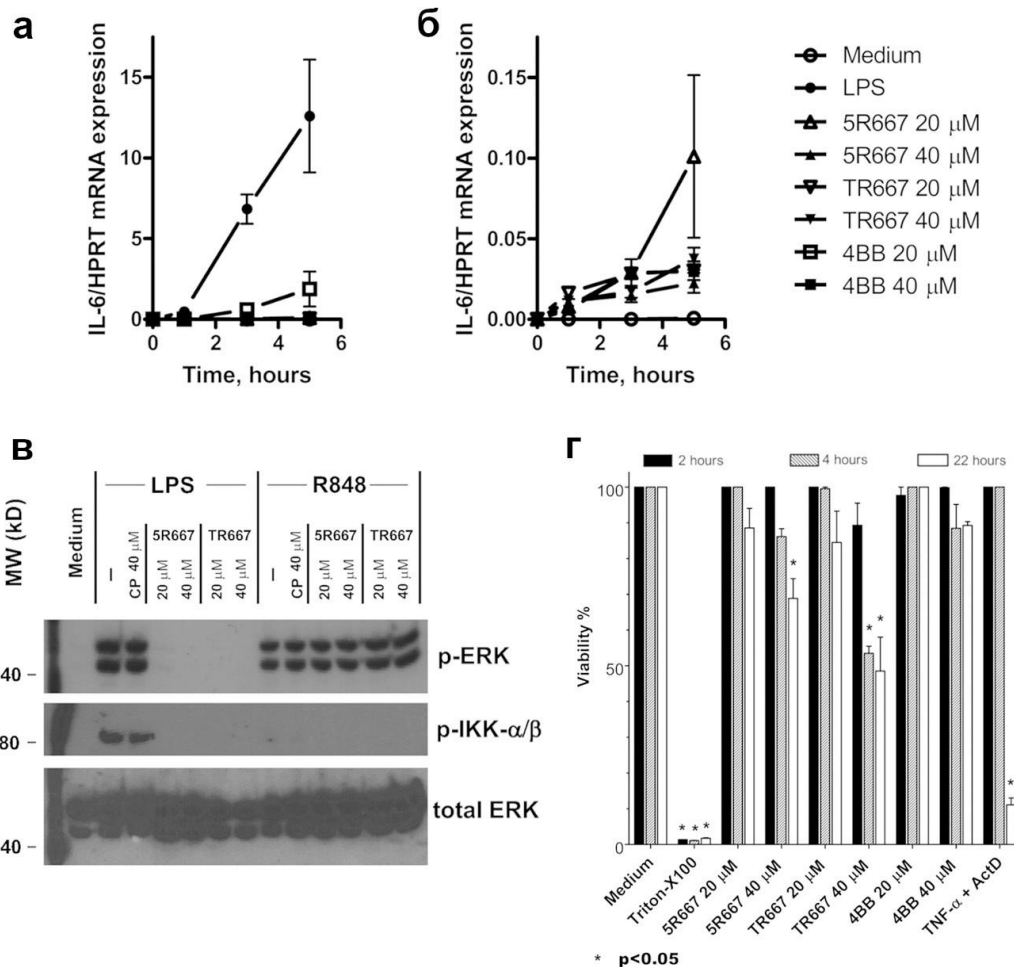


Рисунок 28 — Влияние ингибиторных пептидов на отсроченную экспрессию цитокинов (а, б), фосфорилирование белков (в), и жизнеспособность (г) перитонеальных макрофагов мышей (Javten et al., 2023)

а – перитонеальные макрофаги мышей линии C57/Bl6 инкубировали в присутствии указанных концентраций пептидов в течении 30 минут и стимулировали LPS в конечной концентрации 100 нг/мл. Образцы мРНК выделяли через 1, 3 и 5 часов после стимуляции клеток LPS.

б – в панели **б** представлены данные тех же экспериментов, что и в панели **а**, но в стократно растянутой шкале ординат.

в – клетки обрабатывали пептидами и агонистами TLR, как указано в панели **а**, и лизировали через 30 минут после стимуляции LPS. Лизаты анализировали Вестерн-блоттингом при помощи антител к фосфорилированным и нефосфорилированным формам МАП киназ ERK1/2 и фосфо-IKK α/β .

г – жизнеспособность перитонеальных макрофагов оценивали в МТТ-тесте после 2-х, 4-х и 22-х часов инкубации в присутствии ингибиторных пептидов. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $p < 0,05$.

Практически полное блокирование пептидами 5R667 и TR667 как ранних (фосфорилирование ERK1/2 и IKK α/β , наблюдаемое через 30 минут после стимуляции (Рис. 28в)), так и поздних (экспрессия IL-6 через 5 часов после стимуляции) проявлений активации TLR не может быть объяснено падением общей жизнеспособности клеток. Так, тестирование жизнеспособности макрофагов показало, что, хотя некоторое снижение жизнеспособности клеток и отмечалось после длительной инкубации клеток в присутствии высоких концентраций пептидов (40 мкМ), пептиды в концентрации 20 мкМ не вызывали достоверного снижения жизнеспособности (Рис. 28г).

Представленные результаты показывают, что пептид 5R6 и его модификации являются мультиспецифическими ингибиторами TLR. Помимо ингибирования TLR5 в перитонеальных макрофагах и репортерной линии клеток, пептиды ингибировали TLR2, TLR4 и TLR9, но не ингибировали TLR7. Можно отметить некоторую селективность действия пептидов в отношении продукции отдельных цитокинов. Так, влияние пептидов на экспрессию KC было меньше, чем на экспрессию TNF, IL-1 β , IL-6, или IL-12p40. Также можно отметить, что влияние ингибиторных пептидов было менее выражено в условиях слабого ответа на стимуляцию TLR.

Мультиспецифическое ингибирование пептидом 5R667 функции TLR, однако, не распространялось на рецепторы системы врождённого иммунитета других семейств. Так, пептид 5R667, эффективно ингибируя LPS-индуцированную продукцию цитокинов донорскими моноцитами, был инертен в отношении продукции TNF и IL-6 моноцитами,

стимулированными фиксированными корпускулярными бактериями *E. coli* (Лысакова et. al., 2025). Наблюдаемое различие объяснялось тем, что корпускулярные бактерии фагоцитируются моноцитами и активируют продукцию провоспалительных цитокинов, задействуя цитоплазматические рецепторы NOD1 и NOD2, передача сигнала с которых не задействует TIR домен-содержащие белки (Лысакова et al., 2025; Elinav et al., 2011; Núñez, 2011; Ogura et al., 2001; Zhou et al., 2019).

4.2.3 Скрининг пептидных библиотек TIR доменов адаптерных белков

Привлечение адаптерных белков при активации TLR осуществляется за счёт прямых взаимодействий TIR доменов адаптеров с димеризованными TIR доменами рецепторов. Такой механизм сборки сигнального комплекса предполагает, что блокирующие пептиды, происходящие из TIR доменов адаптеров, также могут эффективно блокировать передачу сигнала TLR, как и рецепторные пептиды. Эта гипотеза была проверена в серии наших работ, протестировавших пептидные библиотеки, созданные на основе последовательностей TIR доменов адаптера MyD88-зависимого сигнального пути, TIRAP, а также адаптеров MyD88-независимого пути, TRAM и TRIF (Couture et al., 2012; Piao, Ru, et al., 2013a; Piao, Vogel, et al., 2013b).

4.2.3.1 Скрининг пептидной библиотеки TIR домена адаптерного белка TIRAP

TIRAP – однодоменный, TIR-содержащий адаптерный белок, который участвует в активации MyD88-зависимого сигнального пути стимулированными TLR (Bonham et al., 2014; Fitzgerald et al., 2001; Horng et al., 2001; Javmen et al., 2018; Yamamoto, Sato, Hemmi, et al., 2002b). Библиотека пептидов TIR домена TIRAP была составлена аналогично рецепторным библиотекам так, что каждый из пептидов представлял нефрагментированный участок поверхности TIR домена, способный

функционировать как сайт TIR-TIR взаимодействия (Couture et al., 2012). Последовательности пептидов и представляемые ими элементы структуры TIR доменов указаны в таблице 1. В первой серии экспериментов пептиды были протестированы на способность подавлять LPS-стимулированную экспрессию мРНК цитокинов. Перитонеальные макрофаги мышей предобрабатывали пептидами в дозе 5 или 20 мкМ (Рис. 29а и б, соответственно) в течение 30 минут и стимулировали LPS в дозе 10 нг/мл. мРНК выделяли через 1 час после стимуляции клеток.

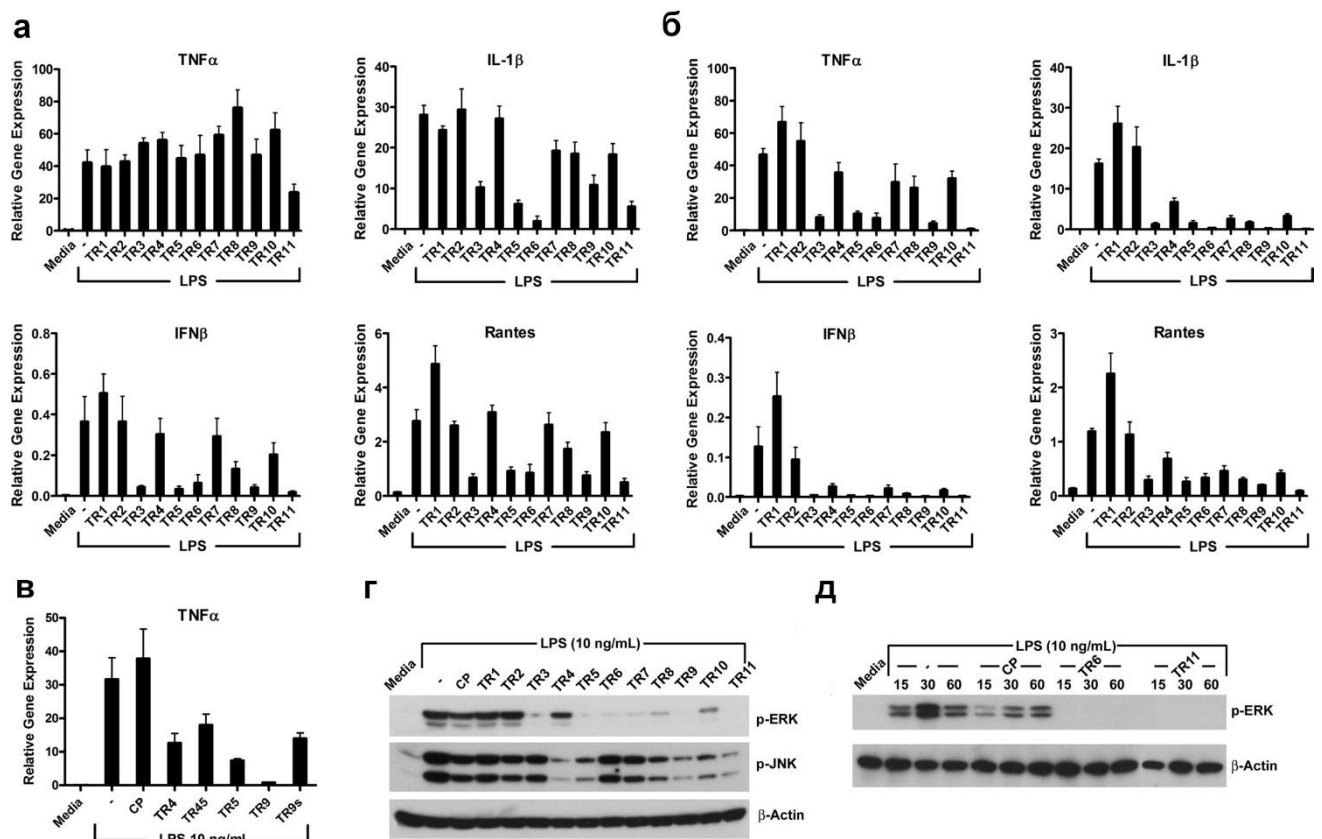


Рисунок 29 — Влияние пептидов, происходящих из TIR домена TIRAP, на индуцированную LPS экспрессию цитокинов (а–в) и активацию МАП киназ (г, д) перитонеальными макрофагами мышей (в) (Couture et al., 2012)

а–в – влияние пептидов на экспрессию *Tnf*, *IL-1 β* , *Ifn- β* и *Rantes* перитонеальными макрофагами, стимулированными LPS (10 нг/мл). Клетки инкубировали в присутствии пептидов в дозе 5 (**а**) и 20 (**б, в**) нг/мл в течении 30 мин перед стимуляцией LPS. Лизаты для выделения мРНК получали через 1 час после стимуляции.

г, д – влияние пептидов на активацию МАП киназ перитонеальными макрофагами, стимулированными LPS. Клетки инкубировали в присутствии 20 мкМ пептидов и стимулировали как описано выше. Лизаты для определения уровня фосфорилирования МАП киназ получали через 30 минут после стимуляции клеток (**г**) или через интервалы времени, указанные в панели **д**.

Результаты скрининга показали, что пептид, включающий в себя петлю АВ (пептид TR3), а также пептиды, соответствующие α -спиралям домена, за исключением α -спирали А (пептиды TR5, TR6, TR9 и TR11), эффективно подавляли экспрессию цитокинов MyD88-зависимого сигнального пути (TNF и IL-1 β), при применении в концентрации 20 мкМ (Рис. 29б). Те же пептиды также оказывали выраженное ингибиторное действие на экспрессию цитокинов, активируемых при участии MyD88-независимого сигнального пути (IFN- β и RANTES), в том числе и при использовании в меньшей концентрации 5 мкМ, тогда как их действие в отношении цитокинов MyD88-зависимого пути TNF и IL-1 β было менее выражено при низкой концентрации пептидов (Рис. 29а).

Библиотека TIRAP пептидов также была скринирована на способность ингибировать LPS-индуцированную активацию МАП киназ ERK и JNK. Пептиды, оказывающие выраженное ингибиторное действие на LPS-индуцированную экспрессию цитокинов (TR3, TR5, TR6, TR9 и TR11), эффективно подавляли и LPS-индуцированную активацию МАП киназы ERK (Рис. 29г). Пептиды TR3 и TR6, однако, не ингибировали активацию JNK (Рис. 29г). Такая кажущаяся селективность действия некоторых пептидов на активацию МАП киназ объяснялась спонтанной активацией киназы JNK, но не ERK при инкубации клеток в присутствии пептидов TR3 и

TR6 (Couture et al., 2012). Отметим, что другие ингибирующие пептиды библиотеки не оказывали активирующего действия на киназу JNK (не показано). Механизм обнаруженного селективного активирующего действия некоторых пептидов на некоторые МАП киназы остаётся не понятным к настоящему времени. Было оценено влияние пептидов TR6 и TR11 на кинетику активации МАП киназы ERK. Оба пептида практически полностью блокировали LPS-индуцированную активацию ERK на протяжении всего периода наблюдения (Рис. 29д).

С целью более полной характеристики трансляционного потенциала блокирующих пептидов было изучено их влияние на секрецию цитокинов стимулированными LPS макрофагами. Секрецию цитокинов оценивали в 5–6-ти и 24-х часовых супернатантах (Рис. 30). Пептиды, оказывающие выраженное ингибиторное действие на раннюю экспрессию мРНК цитокинов, статистически достоверно ингибировали и продукцию цитокинов, оцененную как через 5–6, так и через 24 часа после стимуляции (Рис. 30). Это наблюдение показывает, что ингибиторное действие пептидов долгосрочно и в приблизительно равной степени эффективно как в отношении цитокинов первой волны, так и цитокинов, индуцируемых с задержкой. Одним из примеров цитокинов, индуцируемых с задержкой, является IFN- γ (Toshchakov et al., 2002), содержание которого было ниже порога чувствительности метода в 6-ти часовых супернатантах и резко возрастало через 24 часа после стимуляции. Поздняя секреция IFN- γ , однако, эффективно подавлялась пептидами (Рис. 30ж). Другим примером цитокина, характеризующегося отсроченной продукцией, является RANTES, содержание которого возрастает в ~500 раз в 24-х часовых супернатантах по сравнению с 6-ти часовыми (Рис. 30д и е). Поздняя секреция RANTES достоверно подавлялась блокирующими пептидами аналогично секреции IFN- γ (Рис. 30е). LPS-стимулированная секреция TNF и IL-6 осуществляется преимущественно в первые 6 часов после стимуляции (Рис. 30, панели а и б, в и г, соответственно). Ингибиторные

пептиды достоверно снижали секрецию TNF и IL-6 на протяжении всего периода наблюдения (Рис. 30а–г).

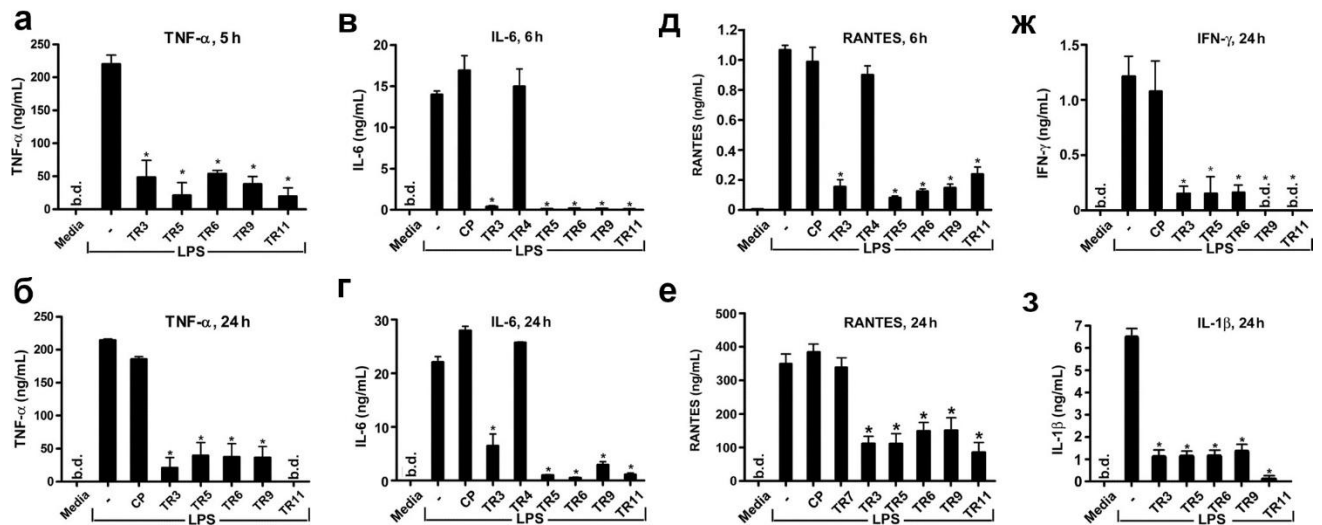


Рисунок 30 — Влияние пептидов, происходящих из TIR домена TIRAP, на индуцированную LPS секрецию цитокинов перитонеальными макрофагами мышей (Couture et al., 2012)

Перитонеальные макрофаги инкубировали в присутствии пептидов в дозе 20 нг/мл в течении 30 минут и стимулировали LPS (10 нг/мл). Супернатанты для определения содержания цитокинов отбирали через указанные интервалы времени после стимуляции.

Поскольку мыши, дефицитные по гену *Tirap*, характеризуются сниженным ответом на агонисты как TLR4, так и TLR2, пептидная библиотека TIRAP также была протестирована на способность пептидов блокировать сигнал TLR2. Сигнал индуцировали как агонистом гетеродимера TLR2/1, P3C в концентрации 500 нг/мл, так и агонистом TLR2/TLR6, P2C в концентрации 50 нг/мл. Перитонеальные макрофаги предобрабатывали пептидами за 30 мин до стимуляции. Пептиды при применении в концентрации 5 нг/мл не оказывали заметного действия на индукцию TNF- α и IL-1 β агонистами TLR2 (не показано). При применении в

концентрации 20 мкМ пептиды TR3 и TR6 снижали экспрессию TNF- α и IL-1 β , индуцированную агонистом TLR2/TLR1 гетеродимера (Рис. 31а), однако не оказывали заметного влияния на экспрессию, индуцированную P2C (Рис. 31б). Увеличение концентрации пептидов TR3 и TR6 до 40 мкМ усиливало дифференциальный эффект на индукцию цитокинов агонистами TLR2/TLR1 и TLR2/TLR6 гетеродимеров (Рис. 31а и б).

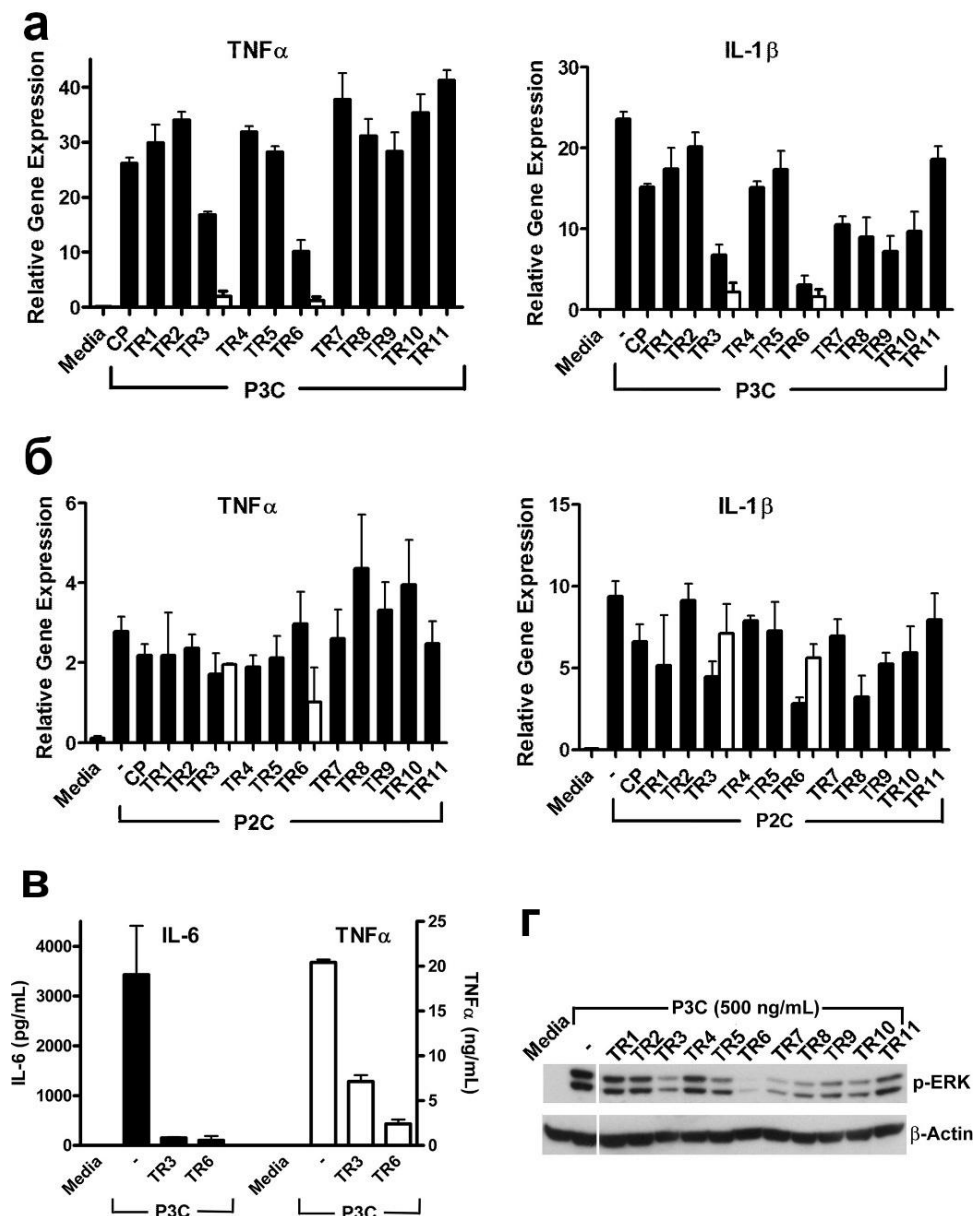


Рисунок 31 — Влияние пептидов, происходящих из TIR домена TIRAP, на экспрессию (а, б) и секрецию (в) цитокинов, а также активацию ERK (г) перитонеальными макрофагами мышей, стимулированными агонистами TLR2 (Couture et al., 2012)

а, б – влияние пептидов на экспрессию *Tnf* и *IL-1 β* перитонеальными макрофагами, стимулированными РЗС (500 нг/мл) (**а, в, г**) или Р2С (50 нг/мл) (**б**). Клетки инкубировали в присутствии пептидов в дозе 20 (чёрные столбцы) или 40 (белые столбцы) мкМ в течении 30 мин перед стимуляцией агонистом TLR. Лизаты для выделения мРНК получали через 1 час после стимуляции.

в – влияние пептидов на секрецию IL-6 и TNF перитонеальными макрофагами. Клетки инкубировали в присутствии пептидов и стимулировали как описано выше. Супернатанты для определения содержания цитокинов отбирали через 5 часов после стимуляции клеток.

г – влияние пептидов на активацию МАП киназы ERK стимулированными РЗС перитонеальными макрофагами. Лизаты для определения уровня фосфорилирования МАП киназ получали через 30 минут после стимуляции клеток.

Блокирующий эффект пептидов TR3 и TR6 также был подтверждён на уровне секреции цитокинов. Оба пептида оказывали выраженное ингибиторное действие на продукцию цитокинов стимулированными РЗС макрофагами (Рис. 31в). Пептиды TR3 и TR6 также ингибировали и РЗС-индуцированную активацию ERK (Рис. 31г).

Скрининг пептидной библиотеки, представляющей вероятные сайты взаимодействия TIR домена адаптерного белка TIRAP, выявил 5 пептидов, блокирующих сигнал TLR4, два из которых также блокировали сигнал, индуцируемый активированным гетеродимером TLR2/TLR1 (Рис. 32). Обнаружение большого количества пептидов, обладающих ингибиторными свойствами, было интерпретировано как следствие множественности TIR-TIR взаимодействий, осуществляемых адаптерным белком TIRAP (Couture et al., 2012). Поскольку TIRAP является вспомогательным адаптером, не играющим самостоятельной роли в передаче сигнала, а способствующим привлечению эффекторного адаптера MyD88 к димеризованному рецептору, ожидалось, что TIRAP, помимо взаимодействия с обоими TIR доменами рецепторного димера, может быть вовлечён и во множественные

адаптер–адаптерные взаимодействия. Помимо множественности сайтов TIR–TIR взаимодействия, присутствующих на TIR доменах рецепторов и адаптеров, сложный характер блокирования сигналинга пептидами, в частности отсутствие ингибирования TLR2/TLR6 сигнала при ингибировании сигнала TLR2/TLR1, по всей видимости, указывало на способность отдельных пептидов связывать различные TIR домены с константами связывания одного порядка. Мультиспецифичность связывания TIR доменов пептидами является ожидаемым признаком, поскольку это свойство повторяет основную функциональную характеристику TIR доменов как класса белков — их способность взаимодействовать с подгруппой, но не со всеми доменами своего класса. Эти гипотезы, высказанные нами в ранних работах, были полностью подтверждены поздними исследованиями нашей и других групп (Clabbers et al., 2021; Javmen et al., 2018; Piao et al., 2015, 2016; Toshchakov & Javmen, 2020; Ve et al., 2017).

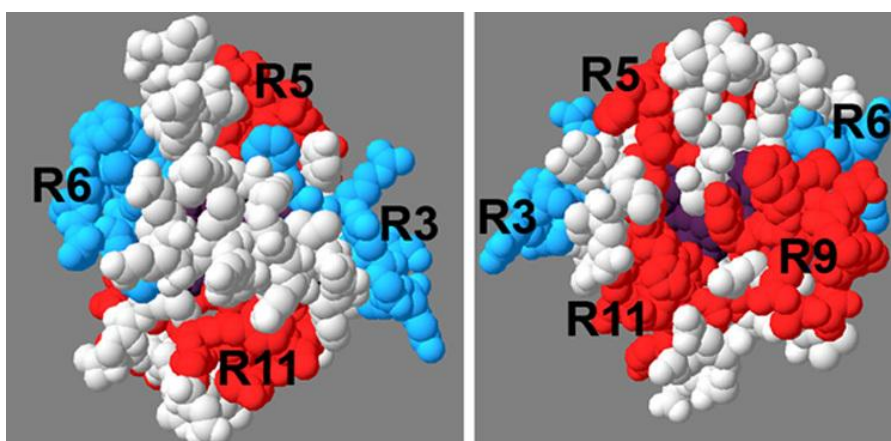


Рисунок 32 — Участки поверхности TIR домена адаптерного белка TIRAP, представленные ингибиторными пептидами (Couture et al., 2012)

Пептиды, блокирующие сигнал TLR4, но не TLR2, показаны красным. Сегменты, соответствующие пептидам, блокирующим сигнал как TLR2, так и TLR4, выделены голубым. Пространственная модель TIR домена TIRAP была любезно предоставлена

Греггом Снайдером и Сэмом Ксиао (Greg Snyder and Sam Xiao, Laboratory of Immunology, NIAID).

4.2.3.2 *Скрининг пептидной библиотеки TIR домена адаптера TRAM*

TRAM (TRIF-Related Adapter Molecule) — однодоменный, TIR содержащий адаптерный белок, обеспечивающий привлечение эффекторного адаптера TRIF к активированному TLR4 (Fitzgerald et al., 2003; Oshiumi, Sasai, et al., 2003b; Yamamoto, Sato, Hemmi, Uematsu, et al., 2003b). Первичный скрининг пептидной библиотеки TIR домена адаптера TRAM был проведён, оценивая раннюю LPS-индуцированную экспрессию цитокинов. Измеряли экспрессию цитокинов как MyD88-зависимого пути, (TNF и IL-1 β), так и TRIF-зависимого пути (RANTES и IFN- β) (Рис. 33а). Два пептида, TM4 (петля BB TRAM TIR домена) и TM6 (третий спиральный участок), оказывали выраженное ингибиторное действие на экспрессию цитокинов, индуцируемых через оба сигнальных пути (Рис. 33а). Те же пептиды ингибировали и позднюю экспрессию цитокинов, измеренную через 5 часов после стимуляции клеток (Рис. 33б). Вместе с тем, можно было отметить менее выраженный эффект ингибиторных пептидов на экспрессию RANTES через 5 часов после стимуляции по сравнению с ранней экспрессией этого цитокина (Рис. 33а и б). Пептиды TM4 и TM6, но не другие пептиды библиотеки, ингибировали и LPS-индуцированную активацию МАП киназ (Рис. 33в).

LPS индуцирует отсроченную активацию фактора транскрипции STAT-1 посредством активации интерфероновых рецепторов первого типа за счёт MyD88-независимой продукции IFN- β макрофагами (Toshchakov et al., 2002). Обработка клеток пептидами TM4 и TM6 полностью блокировала LPS-индуцированное фосфорилирование STAT-1 (Рис. 33г), подтверждая

выраженный эффект пептидов на экспрессию IFN- β (Рис. 33а). Выраженный ингибиторный эффект пептидов TM4 и TM6 на активацию продукции цитокинов также был подтверждён методом иммуноферментного анализа (Рис. 34).

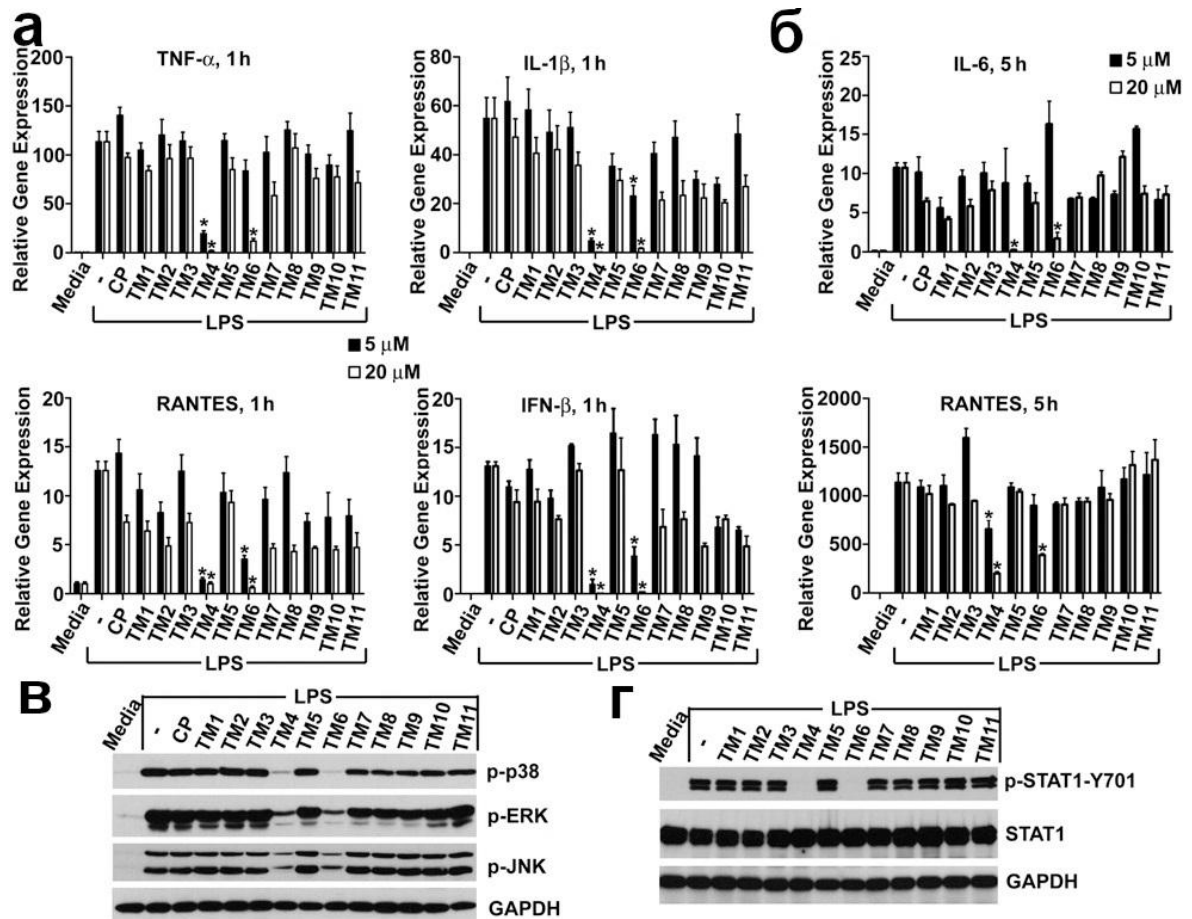


Рисунок 33 — Влияние пептидов, происходящих из TIR домена TRAM, на индуцированную LPS экспрессию цитокинов (а, б), активацию МАП киназ (в) и фактора транскрипции STAT-1 (г) перитонеальными макрофагами мышей (Piao, Vogel, et al., 2013b)

а, б – влияние пептидов на экспрессию *Tnf*, *IL-1 β* , *IL-6*, *Ifn- β* и *Rantes* перитонеальными макрофагами, стимулированными LPS (10 нг/мл). Клетки инкубировали в присутствии пептидов в дозе 5 или 20 нг/мл в течении 30 мин перед стимуляцией LPS. Лизаты для выделения мРНК получали через 1 (а) или 5 (б) часов после стимуляции.

в, г – влияние пептидов на активацию МАП киназ и фактора транскрипции STAT-1 перитонеальными макрофагами. Клетки инкубировали в присутствии 20 мкМ пептидов и стимулировали LPS, как описано выше. Лизаты для определения уровня фосфорилирования МАП киназ получали через 30 минут после стимуляции клеток (**в**). Уровень фосфорилирования STAT-1 определяли через 2 часа после стимуляции клеток (**г**).

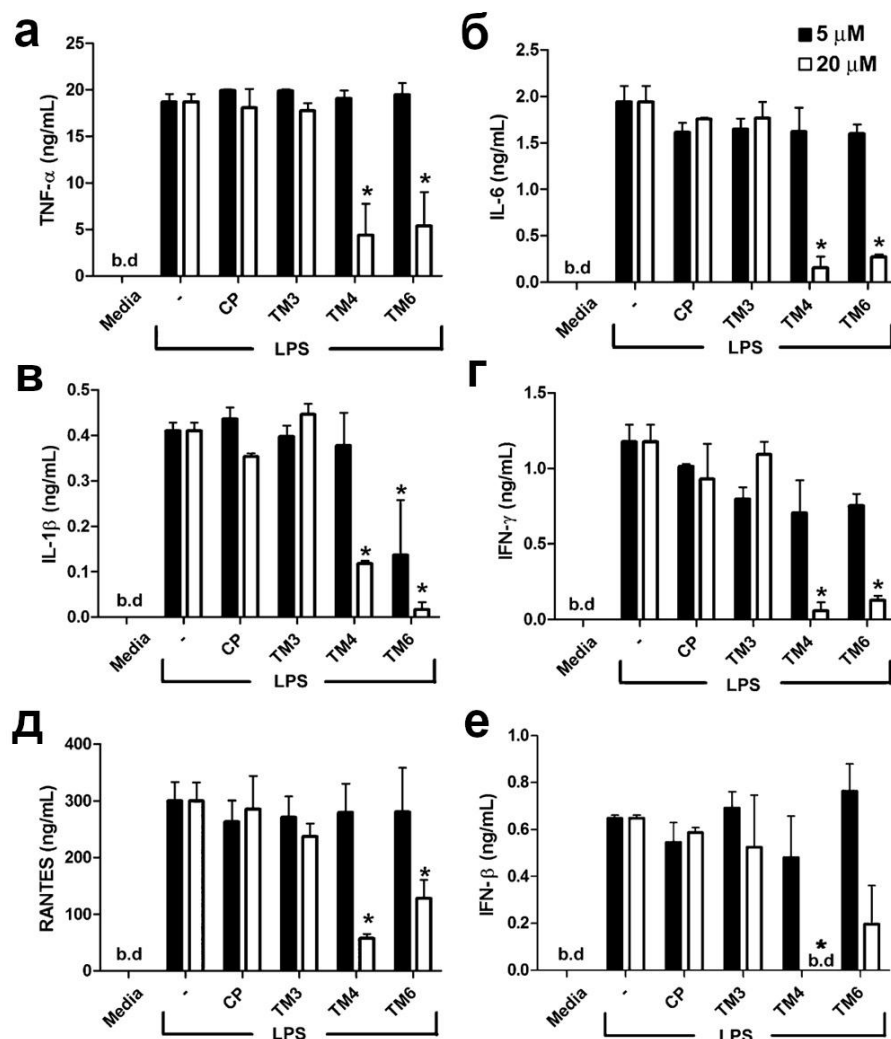


Рисунок 34 — Влияние ингибиторных пептидов TIR домена TRAM на индуцированную LPS экспрессию TNF (**а**), IL-6 (**б**), IL-1 β (**в**), IFN- γ (**г**), RANTES (**д**), и IFN- β (**е**) перитонеальными макрофагами мышей (Piao, Vogel, et al., 2013b)

Перитонеальные макрофаги стимулировали LPS в концентрации 10 нг/мл. Клетки инкубировали в присутствии пептидов в дозе 5 или 20 мкМ в течении 30 мин перед стимуляцией LPS. Супернатанты для определения содержания цитокинов отбирали через 5 часов после стимуляции. Представлены средние и стандартные ошибки среднего данных, полученных в трёх независимых экспериментах. * – $p < 0.01$; b.d. – below detection limit.

Специфичность действия пептидов TM4 и TM6 оценивали, сравнивая их влияние на экспрессию цитокинов и фосфорилирование белков, индуцированных различными членами семейства TLR. Действие TRAM пептидов оказалось специфично в отношении TLR4. Так, пептиды не ингибировали активацию МАП киназ, индуцированную P3C, в отличие от активации, индуцированной LPS (Рис. 35а). Аналогичным образом пептиды действовали и на экспрессию цитокинов, индуцированную агонистами TLR4 и TLR2 – LPS-индуцированная экспрессия IL-1 β и TNF достоверно снижалась пептидами TM4 и TM6, тогда как экспрессия, индуцированная P2C или P3C, не изменялась (Рис. 35б). Пептиды также не ингибировали активацию МАП киназ и экспрессию IFN- β , индуцированные агонистом TLR9, олигонуклеотидом ODN1668, или же агонистом RIG-I-подобных рецепторов (MDA-5 (melanoma-differentiation-associated gene 5) и RIG-I (retinoic-acid-inducible protein 1)) синтетической двуцепочечной полиинозиновой-полицитозиновой РНК в комплексе с трансфицирующим агентом (PIC-LyoVec) (Рис. 35в, г).

Основываясь на ранее сделанном наблюдении о сходности ингибиторных свойств пептидов, происходящих из петли BB TIR доменов TLR адаптеров (Toshchakov et al., 2005), вместе с новым на то время наблюдением, что пептиды, происходящие из третьего спирального участка вспомогательных адаптеров TRAM и TIRAP (пептиды TR6 и TM6), также проявляют ингибиторные свойства, и их последовательности схожи (Рис. 35ж), было предложено сравнительно охарактеризовать блокирующие

пептиды, происходящие из структурно гомологичных участков эффекторных адаптеров (TRIF и MyD88). Экспериментальная проверка показала, что пептид, происходящий из структурно гомологичного региона MyD88, обладал сниженной активностью в сравнении с TR6 и TM6, тогда как аналогичный TRIF пептид подобной ингибиторной активностью не обладал (Рис. 35д и е).

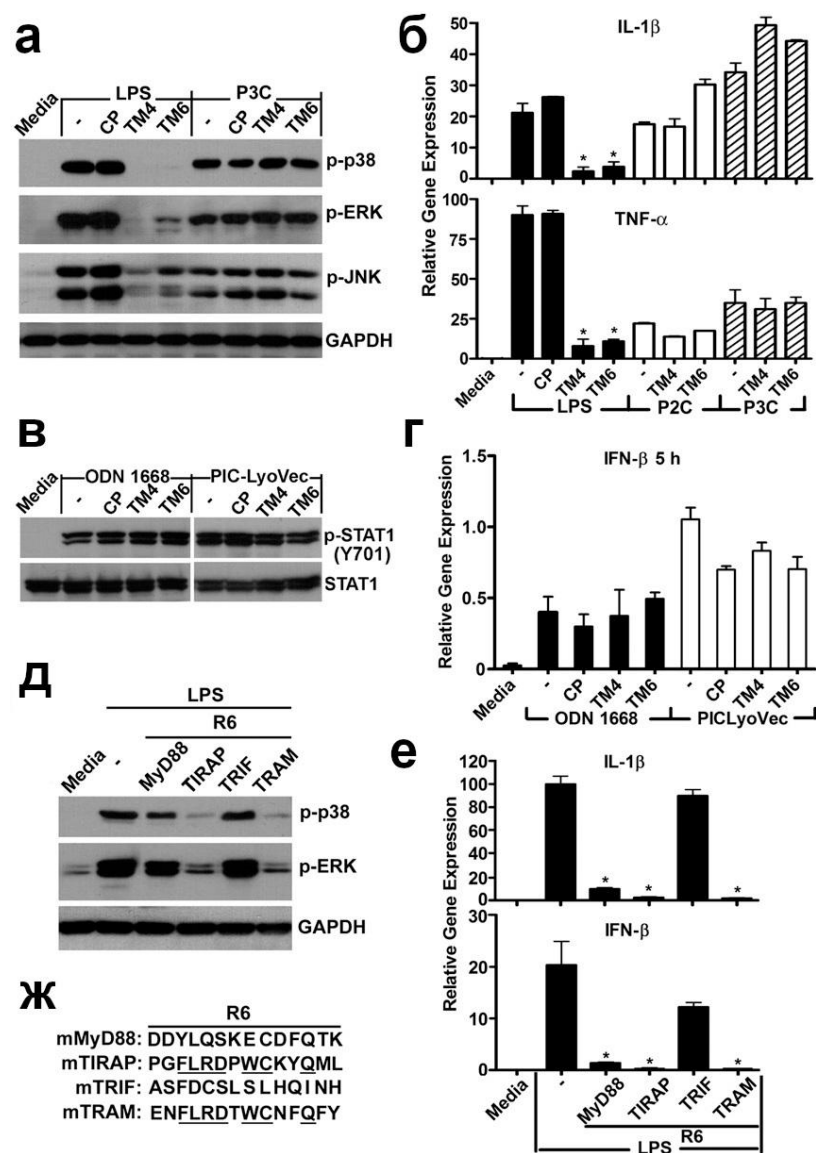


Рисунок 35 — Специфичность действия ингибиторных пептидов на активацию МАП киназ, фактора транскрипции STAT-1 и экспрессию цитокинов, индуцированных различными рецепторами системы врождённого иммунитета (Piao, Vogel, et al., 2013b)

а, б – влияние пептидов ТМ4 и ТМ6 на активацию МАП киназ (**а**) и экспрессию *Tnf* и *IL-1 β* (**б**) перитонеальными макрофагами, стимулированными агонистами TLR4 и TLR2. Клетки инкубировали в присутствии пептидов в концентрации 20 мкМ в течении 30 мин перед стимуляцией. Клетки стимулировали LPS в конечной концентрации 100 нг/мл, Р2С (50 нг/мл) или Р3С (500 нг/мл). Лизаты для определения уровня фосфорилирования МАП киназ и выделения РНК получали через 30 и 60 минут после стимуляции, соответственно.

в, г – влияние пептидов ТМ4 и ТМ6 на активацию фактора транскрипции STAT-1 (**в**) и экспрессию *IFN β* (**г**) перитонеальными макрофагами, стимулированными агонистами TLR9 (ODN1668 1 мкМ) или RIG-I-подобных рецепторов (poly(I:C) РНК в комплексе с трансфицирующим агентом (400 нг/мл)). Клетки инкубировали в присутствии пептидов в концентрации 20 мкМ в течении 30 мин перед стимуляцией. Лизаты для определения уровня фосфорилирования STAT-1 получали через 5 час после стимуляции. Экспрессию *IFN- β* мРНК после стимуляции клеток ODN1668 или трансфицированной poly(I:C) определяли через 5 и 16 часов, соответственно.

д, е – влияние блокирующих пептидов, происходящих из участков TIR доменов адаптерных белков структурно гомологичных ТМ6, на уровень фосфорилирования МАП киназ и экспрессию цитокинов. Экспериментальные условия как в панелях (**а**) и (**б**).

ж – последовательности тестированных пептидов, представляющих N-концевую часть третьего спирального участка TIR доменов адаптерных белков, участвующих в передаче сигнала TLR.

Результаты тестирования пептидов показали, что пептид ТМ4 является одним из наиболее эффективных пептидных ингибиторов TLR4. С целью определить ключевые аминокислотные остатки, ответственные за ингибиторную активность этого пептида, была синтезирована серия модификаций пептида ТМ4. Последовательности модифицированных пептидов представлены в Таблице 1, строки 117–125. В первой серии экспериментов, было тестировано 3 пептида, содержащих одноаминокислотные замены. Была заменена глутаминовая кислота в пятой позиции блокирующей части пептида на аланин (пептид был обозначен как ТМ4-Е/А); также были заменены пролин и цистеин в 7-ой и

8-ой позициях на гистидин (пептиды TM4-P/H и TM4-C/H, соответственно). Тестирование пептидов показало, что одноаминокислотные замены слабо влияли на активность пептидов. Все 3 варианта в значительной мере сохраняли свои ингибиторные свойства, однако можно было отметить несколько сниженную активность пептида TM4-C/H (Рис. 36а и б). Следующие 3 модификации пептида TM4 представляли собой пятиаминокислотные сегменты пептида TM4, образующие его N-концевой, центральный и C-концевой участки (пептиды TM4-N, TM4-M и TM4-C, соответственно (Таблица 1, строки 120-122)). Пептид TM4-N обладал максимальной активностью из трёх, тогда как ингибиторная активность пептида TM4-M была снижена (Рис. 36а и б). Активность пептида TM4-C была минимальна (Рис. 36а и б).

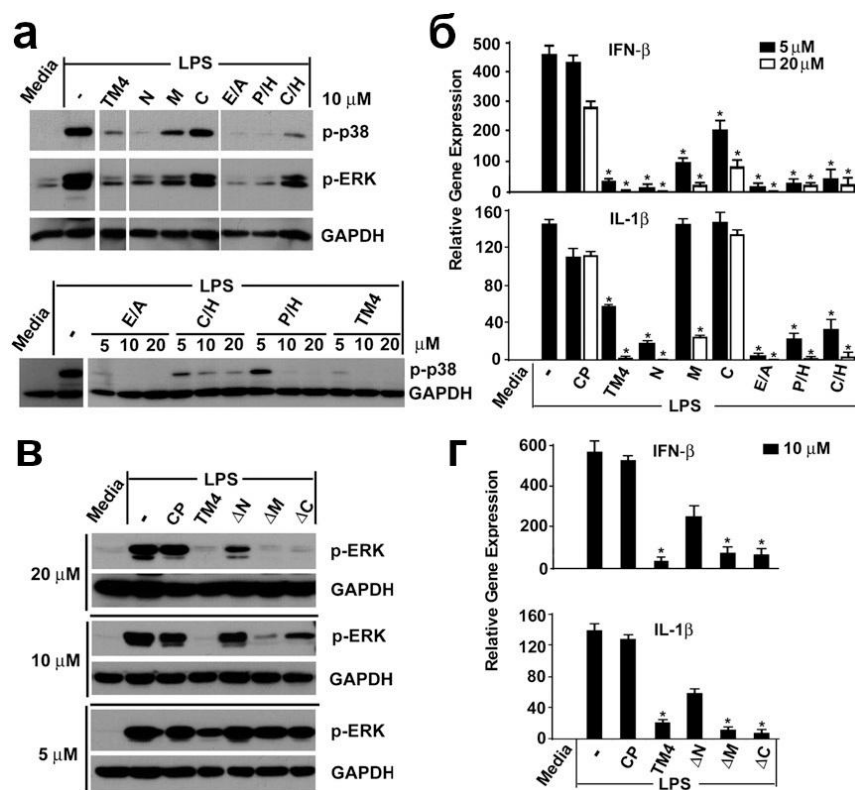


Рисунок 36 — Ингибиторные активности различных модификаций пептида TM4 (Piao, Vogel, et al., 2013b)

Детали экспериментов аналогичны деталям экспериментов, представленных на рисунке 33. Последовательности пептидов представлены в Таблице 1.

Три последние протестированные модификации пептида TM4 представляли собой делеции, в которых участки, включённые в пептиды TM4-N, TM4-M и TM4-C, были удалены. Пептиды были обозначены как TM4- Δ N, TM4- Δ M и TM4- Δ C (Табл. 1, строки 123–125). Результаты тестирования подтвердили, что С-концевой участок оказывает минимальный вклад в ингибиторную активность пептида, поскольку активность пептида TM4- Δ C мало отличалась от активности полноразмерного пептида TM4, тогда как активность пептида TM4- Δ N была заметно снижена (Рис. 36в и г). Пептид TM4- Δ M демонстрировал промежуточные свойства (Рис. 36в и г).

Результаты скрининга библиотеки пептидов TIR домена адаптера TRAM выявили два пептида, обладающих выраженной ингибиторной активностью в отношении TLR4. Ингибиторные пептиды происходили из петли, соединяющей второй тяж со второй спиралью домена (петля BB, пептид TM4), и третьего спирального участка домена (α -спирали C, пептид TM6). Можно отметить, что пептиды, происходящие из петли BB различных TIR доменов, часто проявляют ингибиторные свойства (Toshchakov et al., 2005). То же самое можно сказать и о пептидах N-концевой части третьего спирального участка (регион 6). Так, пептиды 2R6 (библиотека TLR2), TR6 (TIRAP), TM6 (TRAM), 5R6 (TLR5) (все эти пептиды происходят из структурно гомологичных участков TIR домена) демонстрировали выраженную ингибиторную активность. Сравнение ингибиторных свойств различных модификаций пептида TM4 позволило выявить отрезок пептида наиболее важный для блокирования сигнала. Таким отрезком оказался 9-аминокислотный, N-концевой сегмент, присутствие которого практически полностью обеспечивало ингибиторные свойства полноразмерного пептида.

4.2.3.3 Скрининг пептидной библиотеки TIR домена адаптера TRIF и характеристика свойств идентифицированных ингибиторов

TRIF – TIR domain-containing adapter inducing IFN- β , также известный под именем TICAM-1 (TIR domain-containing adaptor molecule 1) – функционирует как адаптерный белок, вовлечённый в передачу сигнала с TLR3 и TLR4 посредством MyD88-независимой активации факторов транскрипции NF- κ B и IRF3 (Oshiumi, Matsumoto, et al., 2003a; Yamamoto, Sato, Mori, et al., 2002b). Участие TRIF в передаче сигнала с TLR4 требует присутствия вспомогательного, TIR домен-содержащего адаптера TRAM (Fitzgerald et al., 2003; Kagan et al., 2008; Oshiumi, Sasai, et al., 2003b). Библиотека проникающих в клетку пептидов, представляющих отдельные сегменты TIR домена адаптера TRIF, была сконструирована и синтезирована аналогично другим описанным выше библиотекам. Последовательности пептидов библиотеки TRIF представлены в таблице 1, строки 135–148. Полученная библиотека была проскринирована на способность пептидов блокировать экспрессию цитокинов, индуцированную LPS в первичной культуре перитонеальных макрофагов. Измеряли раннюю (1 час после стимуляции) экспрессию провоспалительных цитокинов *Tnf* и *IL-1 β* , как представителей генов, активируемых посредством MyD88-зависимого пути, а также *IFN- β* и *RANTES*, индукция которых осуществляется с участием MyD88-независимого, TRIF-зависимого механизма. Также измеряли экспрессию *IL-6*, цитокина, экспрессируемого стимулированными клетками с задержкой. Экспрессию *IL-6* измеряли через 5 часов после добавки LPS. Два пептида библиотеки, TF4 и TF5, оказывали выраженное ингибиторное действие на экспрессию всех протестированных цитокинов, как ранних MyD88-зависимых и TRIF-зависимых цитокинов, так и на позднюю экспрессию *IL-6* (Рис. 37а). Пептид TF4 происходит из петли BB TIR домена, пептид TF5 соответствует α B. Пептиды TF4 и TF5 также оказывали ингибиторное

действие на индуцированную LPS секрецию цитокинов, причём действие TF5 было более выражено (Рис. 37б). Проверка действия TRIF пептидов на активацию МАП киназ (p38, ERK и JNK) подтвердила выраженное ингибиторное действие пептидов TF4 и TF5, но не других пептидов библиотеки (Рис. 37в).

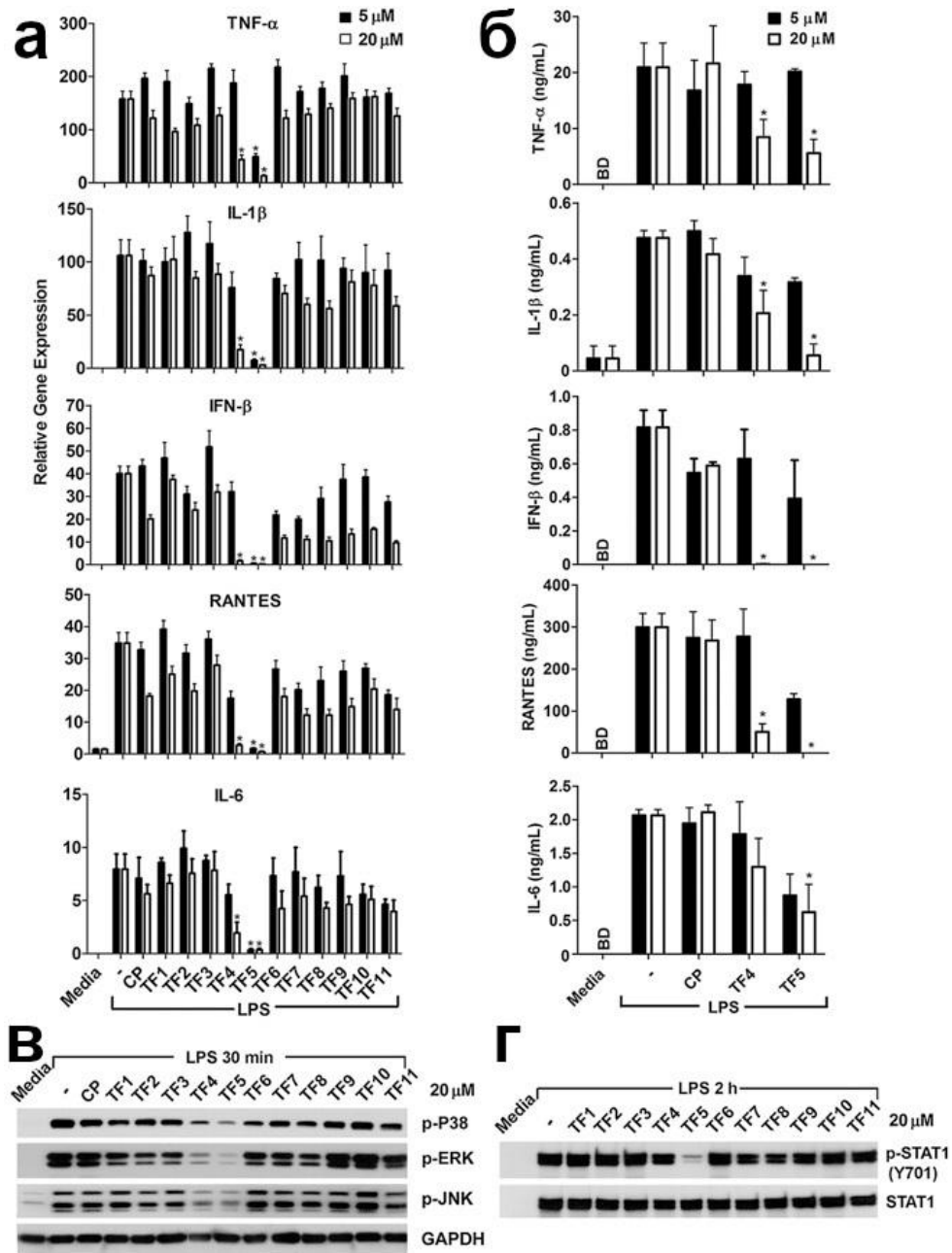


Рисунок 37 — Влияние пептидов, происходящих из TIR домена адаптера TRIF, на индуцированную LPS экспрессию (а) и секрецию цитокинов (б), а также активацию МАП киназ (в) и фактора

транскрипции STAT-1 (з) перитонеальными макрофагами мышей (Piao, Vogel, et al., 2013b)

а – влияние пептидов на экспрессию цитокинов стимулированными LPS перитонеальными макрофагами. Клетки инкубировали в присутствии пептидов в дозе 5 или 20 мкМ в течении 30 мин перед стимуляцией LPS (100 нг/мл). Экспрессию *Tnf*, *IL-1 β* , *IFN- β* и *RANTES* измеряли через 1 час после стимуляции, экспрессию *IL-6* – через 5 часов.

б – влияние пептидов на секрецию цитокинов перитонеальными макрофагами. Супернатанты для определения содержания цитокинов отбирали через 24 часа после стимуляции клеток LPS (100 нг/мл). Клетки предобрабатывали пептидами в концентрации 5 или 20 мкМ за 30 мин до стимуляции LPS.

в, г – влияние пептидов на активацию МАП киназ и фактора транскрипции STAT-1 перитонеальными макрофагами. Клетки инкубировали в присутствии 20 мкМ пептидов 30 минут и стимулировали LPS (100 нг/мл). Лизаты для определения уровня фосфорилирования МАП киназ получали через 30 минут после стимуляции клеток (**в**). Уровень фосфорилирования STAT-1 определяли через 2 часа после стимуляции клеток (**г**).

Стимуляция TLR4, в отличие от TLR2, ведет к активации фактора транскрипции STAT-1 (Toshchakov et al., 2002). STAT-1 активируется позднее МАП киназ и NF- κ B, поскольку фосфорилирование STAT-1 не является прямым следствием активации TLR4, а происходит вследствие LPS-индуцированной продукции IFN- β и аутокринной активации им рецепторов интерферона первого типа (Toshchakov et al., 2002). Пептид TF5 эффективно ингибировал LPS-стимулированную активацию STAT-1, тогда как TF4 не оказывал выраженного действия (Рис. 37г). Сниженная эффективность TF4 в отношении активации STAT-1 объясняется меньшей эффективностью этого пептида в отношении LPS-индуцированной продукции цитокинов (Рис. 37б).

Селективность действия пептидов TF4 и TF5 оценивали по их способности ингибировать проявления активации различных рецепторов

системы врождённого иммунитета. Тестировали влияние пептидов на экспрессию цитокинов, активированную агонистами TLR9, TLR2, TLR3, а также активатором RIG-I-подобных рецепторов, poly(I:C)-LyoVec (InVivoGen, USA). Пептиды TF4 и TF5 не влияли на экспрессию IFN- β при активации TLR9 или RIG-I-подобных рецепторов (Рис. 38а), а также на экспрессию провоспалительных цитокинов, активированную агонистами TLR2 (Рис. 38б). TF4, однако, несколько подавлял экспрессию IFN- β , активированную агонистом TLR3 poly(I:C) (Рис. 38а). Последний эффект может быть объяснён способностью TIR домена адаптера TRIF связывать напрямую TIR домен TLR3 (Oshiumi, Matsumoto, et al., 2003a; Yamamoto, Sato, Mori, et al., 2002b). Снижение экспрессии IFN- β мРНК, однако, не предотвращало активацию STAT-1 в стимулированных poly(I:C) клетках (Рис. 38в), что, по всей вероятности, обусловлено не полным ингибированием экспрессии и секреции IFN- β пептидом TF4 (Рис. 38а). Пептиды TF4 и TF5 не оказывали выраженного действия на активацию МАП киназ, индуцированную агонистами TLR2 (Рис. 38г), тем самым показывая селективность их действия в отношении TLR4.

В следующей серии экспериментов была протестирована видоспецифичность ингибирования TLR4 пептидами TF4 и TF5. Сравнивали эффекты пептидов на LPS-индуцированную активацию цитокинов и МАП киназ перитонеальными макрофагами мышей и клетками человеческой линии THP-1. В дополнение к скринированным последовательностям был синтезирован пептид hTF5, который соответствовал последовательности структурно гомологичного участка TRIF человека и отличался от мышиного прототипа двумя аминокислотными заменами на С-конце (Рис. 39б, Табл. 1). Кроме hTF5 был дополнительно синтезирован и пептид TF5- Δ C, представляющий участок TF5, идентичный в последовательности человеческого и мышиного белка (Рис. 39б). Тестирование пептидов TF5, hTF5 и TF5- Δ C не выявило

существенных различий в их эффективности — все модификации оказывали выраженное ингибиторное действие как в мышинной системе, так и в клетках человека (Рис. 39а–г).

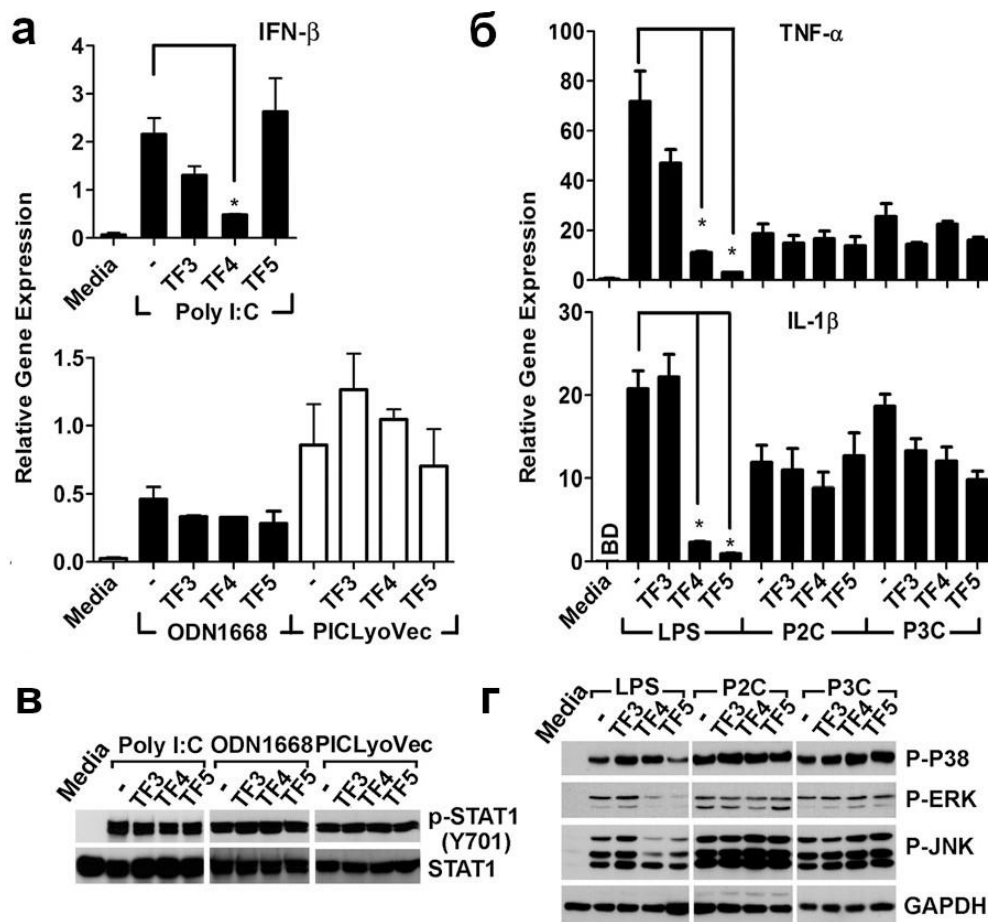


Рисунок 38 — Селективность действия ингибиторных пептидов, происходящих из TIR домена TRIF, на экспрессию цитокинов (а, б) и фосфорилирование белков (в, г), индуцированных активацией различных рецепторов системы врождённого иммунитета (Piao, Vogel, et al., 2013b)

а — влияние пептидов на экспрессию IFN- β перитонеальными макрофагами, стимулированными агонистом TLR3 poly-I:C (50 мкг/мл), агонистом TLR9 олигонуклеотидом ODN1668 (1 мкМ) и активатором RIG-I-подобных рецепторов LyoVec в концентрации 400 нг/мл (poly-I:C в комплексе с трансфицирующим агентом) (InVivoGen, USA). Пептиды применяли в дозе 20 мкМ.

б – влияние пептидов на экспрессию провоспалительных цитокинов перитонеальными макрофагами, стимулированными агонистами TLR4 и TLR2.

в, г – влияние пептидов на активацию фактора транскрипции STAT-1 и МАП киназ различными рецепторами врожденного иммунитета в перитонеальных макрофагах. Клетки инкубировали в присутствии 20 мкМ пептидов 30 минут и стимулировали. Уровень фосфорилирования STAT-1 определяли через 2 часа после стимуляции клеток (**в**). Лизаты для определения уровня фосфорилирования МАП киназ получали через 30 минут после стимуляции клеток (**г**).

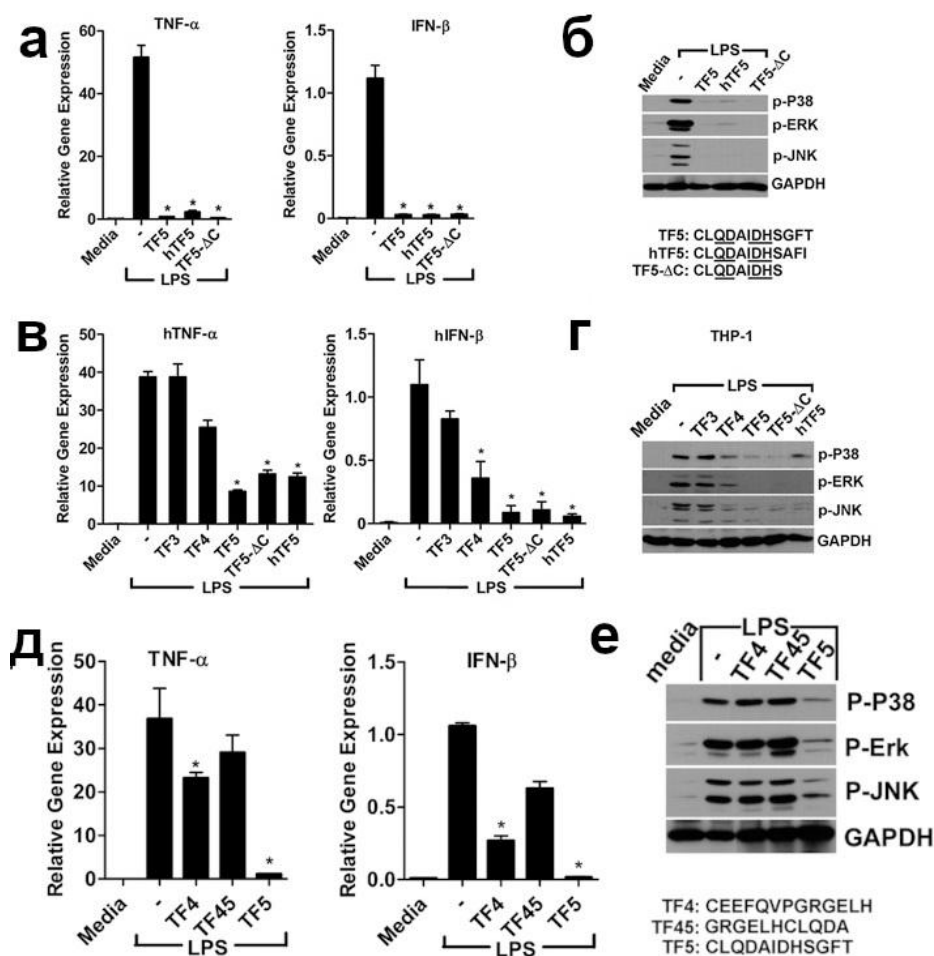


Рисунок 39 — Пептид TF5 ингибирует ответы на активацию TLR4 как в макрофагах мыши, так и в клетках человека (Piao, Vogel, et al., 2013b)

а – влияние пептидов-модификаций TF5 на экспрессию TNF и IFN- β перитонеальными макрофагами мышей. Пептиды применяли в дозе 20 мкМ. LPS применялся в концентрации 100 нг/мл.

б – влияние пептидов-модификаций TF5 на активацию МАП киназ перитонеальными макрофагами мышей. Клетки лизировали через 30 мин после стимуляции LPS (100 нг/мл). Пептиды применяли в дозе 20 мкМ.

в, г – влияние пептидов на экспрессию TNF и IFN- β и активацию МАП киназ клетках линии THP-1. Остальные детали экспериментов аналогичны представленным в панелях **(а и б)**.

д, е – влияние пептидов на экспрессию TNF и IFN- β и активацию МАП киназ перитонеальными макрофагами мышей. Остальные детали экспериментов аналогичны представленным в панелях **а и б**.

Поскольку обнаруженные в результате скрининга ингибирующие пептиды TF4 и TF5 представляют прилегающие друг к другу участки поверхности TIR домена, был синтезирован дополнительный пептид TF45, который соответствовал участку поверхности TIR домена, пограничному между участками, представляемыми пептидами TF4 и TF5. Пептид TF45 включал в себя 5 N-концевых аминокислотных остатков пептида TF5 и C-концевой участок TF4. TF45 не оказывал выраженного ингибиторного действия в отличие от пептидов TF4 и TF5 (Рис. 39**д** и **е**). Данное наблюдение, по всей вероятности, показывает, что пептиды TF4 и TF5 представляют отдельные сайты связывания и различаются по механизму действия.

4.2.3.4 Механизм ингибиторного действия TRIF-пептидов TF4 и TF5

TLR4 отличен от остальных TLR тем, что это единственный член семейства, способный активировать как MyD88-зависимый, так и TRIF-зависимый сигнальный путь, тогда как большинство членов семейства использует только MyD88-зависимый путь, а TLR3 использует TRIF-зависимый путь, но не активирует MyD88 (Kawai et al., 2024). С целью выяснения механизмов ингибиторного действия пептидов TF4 и TF5 было оценено их влияние на проявления активации TLR4 в моделях дефицитных

по адаптерам MyD88 и TRIF. Для оценки влияния пептидов на MyD88-зависимый сигнальный путь использовали иммортализованные костномозговые макрофаги, полученные от мышей с нокаутом по гену TRIF (TRIF KO iBMDM). Влияние пептидов на TRIF-зависимый путь оценивали, используя первичные культуры перитонеальных макрофагов, полученные от мышей с нокаутом гена MyD88 (MyD88 KO pMac). Известно, что в отсутствие TRIF клетки сохраняют способность продуцировать провоспалительные цитокины при активации TLR4, но теряют способность продуцировать интерфероны первого типа и другие IRF-зависимые гены (Yamamoto, Sato, Hemmi, Hoshino, et al., 2003b), тогда как в отсутствие MyD88 в значительной мере снижается способность продуцировать провоспалительные, NF-κB-зависимые цитокины, но сохраняется активация интерферонов (Toshchakov et al., 2002). Тестирование ингибиторных пептидов в TRIF-дефицитных клетках показало, что пептид TF5, а также его версия с делецией С-конца, пептид TF5-ΔC, не проявляли ингибиторную активность ни в отношении LPS-индуцированной продукции провоспалительных цитокинов (Рис. 40а), ни в отношении активации МАП киназ (Рис. 40в). В MyD88-дефицитных макрофагах, напротив, ингибиторная активность TF5 полностью сохранялась (Рис. 40б и г). Эти результаты показывают, что TF5 оказывает своё ингибиторное действие, главным образом, посредством ингибирования TRIF-зависимого пути, тогда как его воздействие на MyD88-зависимый путь минимально.

Эксперименты с использованием клеток, полученных от мышей, дефицитных по гену MyD88, подтвердило заключение о преимущественном действии пептида TF5 на активацию TRIF-зависимого пути. Так, пептид TF5 полностью сохранял своё ингибиторное действие на экспрессию цитокинов и активацию STAT-1 в макрофагах, не экспрессирующих функциональный MyD88 (Рис. 40б), что резко отличалось от его действия в TRIF-дефицитных клетках, в которых ингибиторное действие полностью отсутствовало (Рис. 40а). Ингибиторное действие пептида TF4 на индуцированную LPS

экспрессию IRF-3-зависимых генов (IFN- β и RANTES), напротив, заметно снижалось в MyD88-дефицитных перитонеальных макрофагах по сравнению с клетками дикого типа (Рис. 40б), указывая на то, что ингибиторное действие этого пептида проявляется за счёт ингибирования MyD88-зависимого пути. TF4 не влиял на активацию STAT-1 как в макрофагах дикого типа (Рис. 37г, 40г), так и в MyD88-дефицитных макрофагах (Рис. 40г), что также указывает на вовлечённость MyD88-, а не TRIF-зависимого пути в ингибирование этим пептидом (Рис. 37а, 40б).

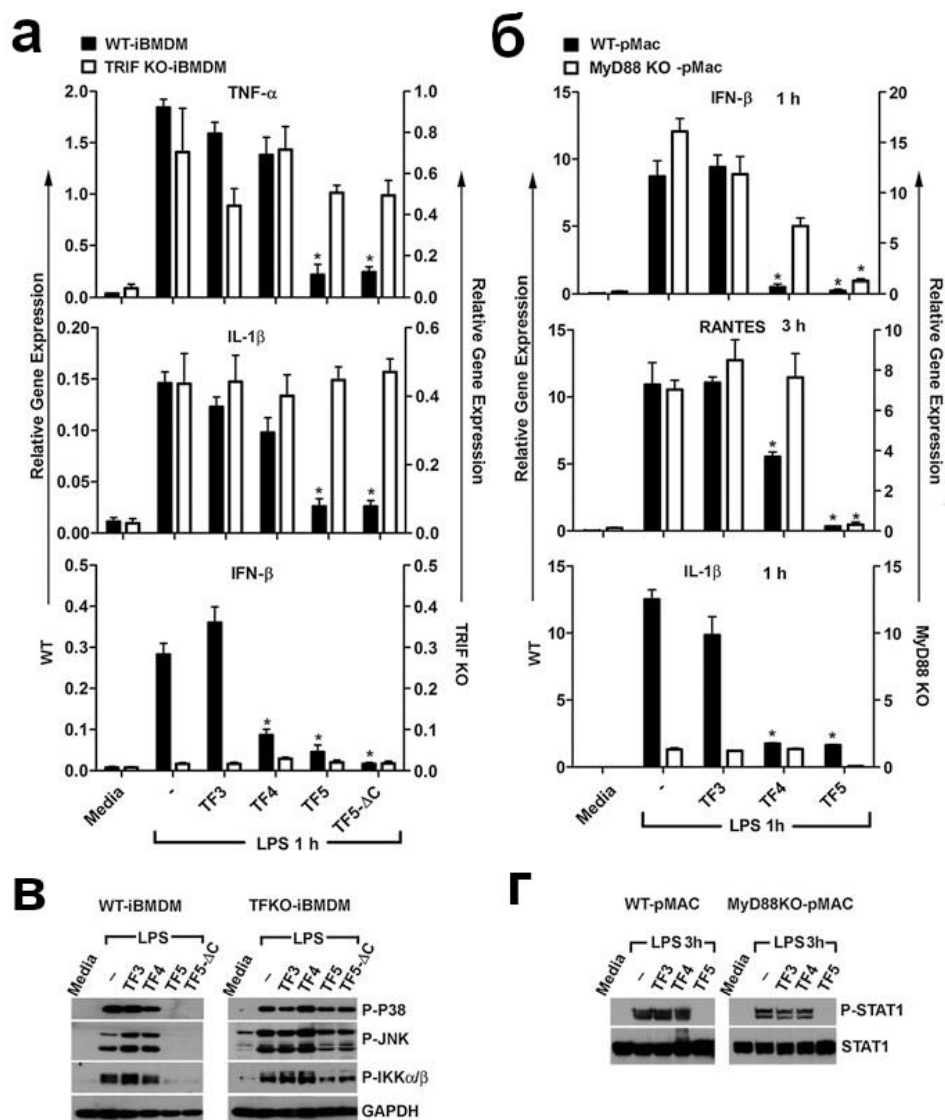


Рисунок 40 — Пептид TF5 специфически блокирует TRIF-зависимую активацию цитокинов и МАП киназ (Piao, Vogel, et al., 2013b)

а – влияние пептидов TF4 и TF5 на экспрессию цитокинов иммортализованными макрофагами костного мозга мышей дикого типа (чёрные столбцы) и мышей, дефицитных по гену *Trif* (белые столбцы). Клетки обрабатывали пептидами и стимулировали, как указано на Рис. 39.

б – влияние пептидов TF4 и TF5 на экспрессию цитокинов иммортализованными макрофагами костного мозга мышей дикого типа (чёрные столбцы) и мышей, дефицитных по гену *Myd88* (белые столбцы).

в, г – влияние пептидов на стимулированную LPS активацию МАП киназ и фактора транскрипции STAT-1 в макрофагах, дефицитных по гену *Trif* (**в**) или *Myd88* (**г**). Лизаты для определения уровня фосфорилирования МАП киназ получали через 30 минут после стимуляции клеток (**в**). Уровень фосфорилирования STAT-1 определяли через 3 часа после стимуляции (**г**).

С целью проверки положения о том, что ингибиторное действие пептида TF5 обусловлено его влиянием на белки TRIF-зависимого пути, использовали метод дот-блоттинга для изучения связывания пептидов TF4 и TF5 с TIR доменами белков, участвующих в передаче сигнала TLR4. Инертный пептид TF3 в этих экспериментах использовался в качестве негативного, не связывающегося с TIR доменами контроля. В качестве положительных контролей на связывание с отдельными TIR доменами использовали пептиды 4BB, TR6 и 4R9, способность которых связывать TIR домены TLR4, MyD88 и TIRAP, соответственно, была показана ранее в независимых экспериментах (Couture et al., 2012; Szmackinski et al., 2014; Toshchakov et al., 2011).

Пептид TF4 копреципитировался с TLR4 (Рис. 41а), но не с TIR доменами адаптеров TRAM, MyD88, или TIRAP (Рис. 41б–г). Можно отметить, что связывание пептидов TF4 с TLR4 было заметно меньше связывания TLR4 с контрольным пептидом 4BB, который, как ранее было показано, связывает TIR домен TLR4 и является эффективным ингибитором как MyD88-, так и TRIF-зависимых ветвей сигналинга TLR4

(Toshchakov et al., 2007b, 2011). Умеренное связывание TF4 с рецептором, но не с адаптерными белками, объясняет наблюдаемое действие пептида на обе ветви TLR4 сигналинга в клетках дикого типа (Рис. 37), а также на отсутствие ингибиторного действия пептида в некоторых системах вследствие вероятного неполного блокирования пула рецепторов пептидом из-за низкой аффинности взаимодействия.

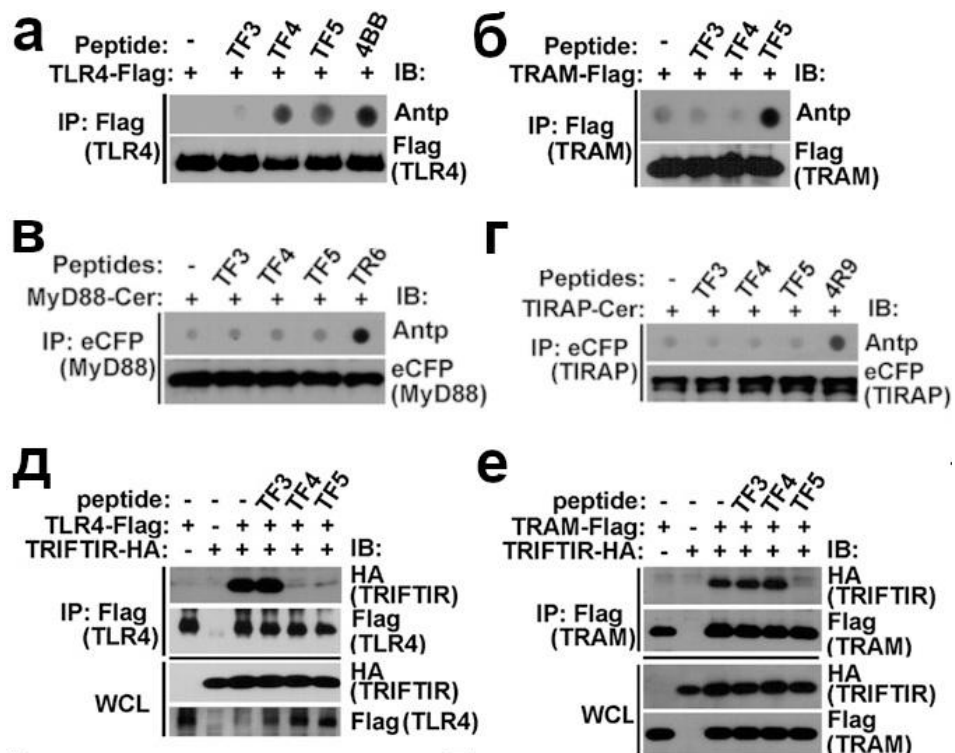


Рисунок 41 — Связывание ингибиторных пептидов TF4 и TF5 различными TIR доменами (Piao, Vogel, et al., 2013b)

а–г – связывание пептидов TF4 и TF5 TIR доменами белков, вовлечённых в формирование сигнальных комплексов рецептором TLR4. Лизаты клеток HEK293T (100 мкг общего белка), транзientно экспрессирующих белковые конструкции Flag-TLR4 (**а**), Flag-TRAM (**б**), MyD88-TIR-Cer (**в**) или TIRAP-Cer (**г**) инкубировали в присутствии 20 мкМ пептидов и преципитировали антителами к соответствующей белковой метке (Flag или Cer). Содержание пептидов в преципитатах определяли методом дот-блоттинга, используя антитела к проникающей последовательности *Antp*, общей для всех протестированных пептидов. Пептиды 4BB (Szmackinski et al., 2014; Toshchakov et al., 2011), TR6 (Couture et al., 2012) и 4R9 (Toshchakov et al., 2011) использовали как

положительный контроль связывания с TIR доменами TLR4, MyD88 и TIRAP, соответственно.

д, е – влияние пептидов на копреципитацию TIR домена TRIF с TLR4 (**д**) или TRAM (**е**).

Пептид TF5 демонстрировал связывание с TLR4, аналогичное таковому пептида TF4: оба пептиды связывали домен, но связывание было несколько меньше такового, демонстрируемого контрольным пептидом 4BB (Рис. 41а). Свойства пептидов TF4 и TF5, однако, резко различались в связывании с TIR доменом TRAM: TF5 связывался с TRAM, тогда как TF4 нет (Рис. 41б). Специфическое связывание TF5 с TRAM объясняет выраженное ингибиторное действие этого пептида в отношении TRIF-зависимого сигнального пути, в частности, отсутствие его ингибиторного действия в клетках, не экспрессирующих функционально полноценный TRIF (Рис. 40а и в).

TRIF связывает TLR4 не напрямую, а с участием вспомогательного адаптера TRAM (Kagan et al., 2008; Oshiumi, Sasai, et al., 2003b; Yamamoto, Sato, Hemmi, Uematsu, et al., 2003b). Соответственно, ожидалось, что пептиды, блокирующие рецептор (TLR4 в данном случае) или адаптеры MyD88-зависимого пути (TIRAP и MyD88), могут и не блокировать копреципитацию взаимодействующих напрямую TIR доменов TRIF и TRAM. Это предположение было проверено и подтверждено экспериментально. Пептид, не связывающий TRAM напрямую (пептид TF4), не блокировал копреципитацию TRIF и TRAM, тогда как TRAM-связывающий пептид (TF5) блокировал (Рис. 41е). Пептид TF4, однако, блокировал преципитацию TRIF и TLR4 (Рис. 41д), что объясняется связыванием этого пептида с TLR4 (Рис. 41а).

В заключение раздела можно сказать, что скрининг пептидной библиотеки TIR домена адаптера TRIF выявил 2 ингибирующих пептида:

происходящий из петли BB пептид TF4, и соответствующий второй α -спирали пептид TF5. Пептид TF5 преимущественно ингибировал TRIF-зависимый сигнальный путь за счёт связывания адаптерного белка этого пути (TRAM), тогда как TF4 связывал TIR домен рецептора и действовал на оба сигнальных пути.

4.3 Механизм действия блокирующих пептидов: специфичность и аффинность взаимодействия блокирующих пептидов 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 взаимодействий полноразмерных белков-прототипов. На практике, однако, описанные выше в разделе 4.2 БП были идентифицированы не по связыванию с мишенью в системе *in vitro*, а в функциональных тестах путём скрининга пептидных библиотек. Очевидно, что верификация механизма действия БП, идентифицированных по ингибированию функции, должна включать подтверждение прямого связывания БП с белком-мишенью. Описанные выше эксперименты по определению TIR доменов, связываемых ингибиторными пептидами TF4 и TF5 методами дот-блоттинга и иммунопреципитации (Рис. 41), частично подтверждают механизм ингибирования, однако такие эксперименты выполнены в *in vitro* модели и не исключают непрямого взаимодействия пептида с преципитируемыми белками. С целью подтверждения прямого взаимодействия блокирующих пептидов с белками-мишенями в клетках нами была разработана и успешно применена система детекции прямых белок-пептидных взаимодействий *in situ* непосредственно в клетках. Система основывается на Фёрстеровском резонансном переносе энергии (FRET (Förster Resonance Energy Transfer)) между флуоресцентно мечеными участниками взаимодействия. В качестве донора энергии

использовался флуоресцентный белок Cerulean (Cer) (Rizzo et al., 2004), присоединённый посредством короткого аминокислотного линкера к С-концу TIR домена, являющегося предполагаемой мишенью пептида. В качестве акцептора энергии использовали конъюгированные с пептидами флуоресцентные красители, способные поглощать флуоресценцию донорской метки. Использовали либо краситель Bodipy-TMR-X (BTX), либо СуЗ, которые конъюгировали с N-концом исследуемого БП. Прямое связывание БП с TIR доменами идентифицировали по тушению флуоресценции донора, которое детектировали как по снижению интенсивности флуоресценции, так и по снижению времени затухания флуоресценции.

Использовали следующую экспериментальную схему: клетки, экспрессирующие флуоресцентно меченые TIR домены, инкубировали 1 час в присутствии флуоресцентно меченых БП, затем препарат фиксировали и анализировали флуоресценцию белковой метки в присутствии различных концентраций пептидов. В пилотной серии экспериментов изучали связывание ингибиторных пептидов, происходящих из TIR домена TLR4, с TLR4 и TLR2. В предварительных экспериментах верифицировали экспрессию донора по флуоресценции белковой метки, а также проникновение меченого пептида в клетки. Микрофотографии, представленные на рисунке 42, подтверждают как экспрессию трансфицированного, флуоресцентно меченого TIR домена (панель а), так и проникновение меченого пептида в цитоплазму клеток (панель б). Отсутствие влияния меток на функциональность полноразмерных TIR доменов и пептидов также было проверено экспериментально. Так, пептид 4BB, меченый красителем Bodipy-TMR-X (пептид BTX-4BB), сохранял ингибиторные свойства, аналогичные таковым немеченого прототипа как в отношении активации МАП киназ, так и в отношении индукции цитокинов (Рис. 42в и г). Отсутствие значимого влияния присоединённого Cer на взаимодействия TIR домена могло бы быть подтверждено снижением

времени жизни флуоресценции TLR4-Cer за счёт тушения флуоресценции по механизму миграции энергии при димеризации метки (Koushik & Vogel, 2008; Toshchakov et al., 2011). Действительно, обработка экспрессирующих TLR4-Cer клеток LPS вызывала достоверное снижение времени жизни флуоресценции TLR4-Cer, тем самым подтверждая способность TIR доменов TLR4 димеризоваться и, как следствие, вызывать сближение меток и тушение их флуоресценции (Рис. 42д).

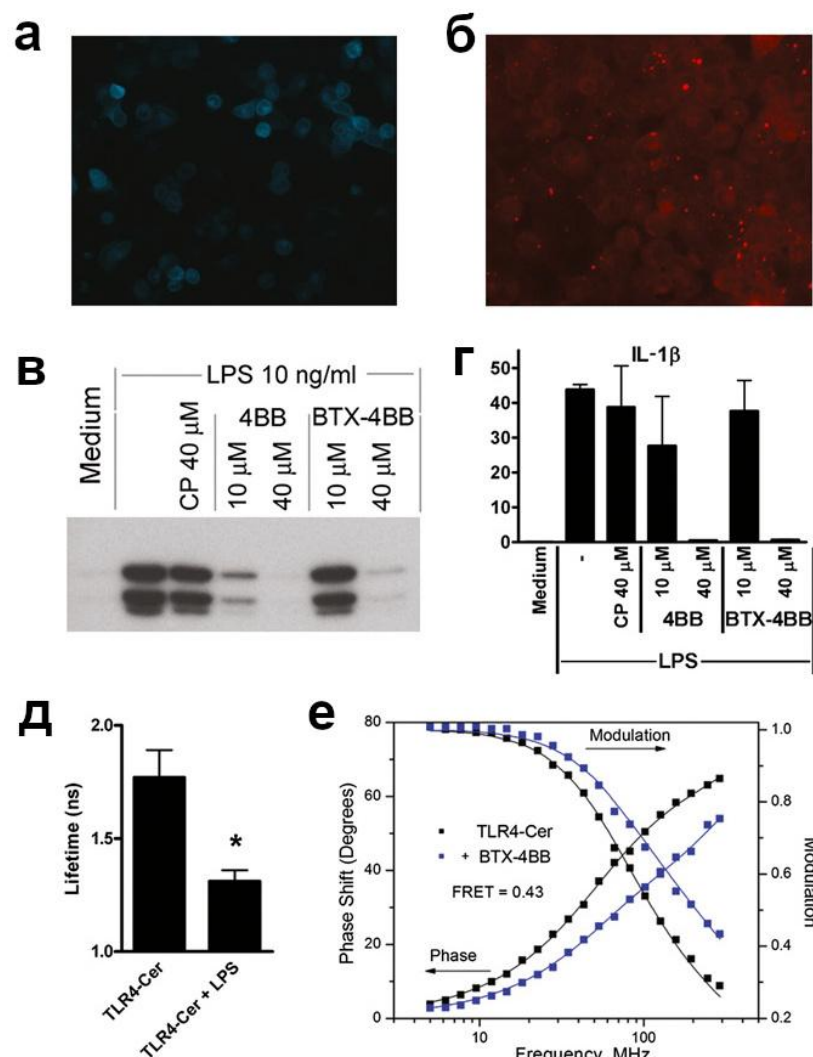


Рисунок 42 — Характеристики FRET системы для детекции прямого внутриклеточного связывания блокирующих пептидов с TIR доменами (Toshchakov et al., 2011)

а – флуоресцентное изображение клеток линии HeLa, экспрессирующих TLR4-Cer. Микрофотография получена на инверсионном флуоресцентном микроскопе Nikon Eclipse TE2000-S с использованием CFP светофильтров (Nikon).

б – флуоресцентное изображение клеток линии HeLa, инкубированных в течение 1 часа в присутствии 40 мкМ пептида 4BB конъюгированного с BTX. Микрофотография получена на инверсионном флуоресцентном микроскопе Nikon Eclipse TE2000-S с использованием блока светофильтров G-2E/C (Nikon).

в, г – влияние флуоресцентной метки на ингибиторную активность пептида 4BB в отношении LPS-индуцированной активации МАП киназы ERK (**в**) и экспрессии цитокиновой мРНК (**г**).

д – стимуляция клеток линии HeLa, экспрессирующих TLR4-Cer, липополисахаридом (500 нг/мл, 1 час) снижает время жизни флуоресценции белковой метки.

е – тушение флуоресценции TLR4-Cer в присутствии флуоресцентно меченого, TIR-связывающего пептида BTX-4BB проявляется в снижении модуляции флуоресценции и повышении фазового сдвига в диапазоне частот модуляции возбуждения флуоресценции 5–300 МГц. Клетки HeLa или HEK293T, экспрессирующие TLR4-Cer, инкубировали в течение часа в присутствии 40 мкМ пептида 4BB или без него и фиксировали. Время жизни флуоресценции измеряли, используя флуориметр K2 (ISS, Champaign, IL) в связке с микроскопом (Axiovert TV130, Zeiss). Флуоресценцию возбуждали посредством голубого фотодиода в комбинации со светофильтром 436/20 нм. Флуоресценцию детектировали через светофильтр 480/40 нм. Кривые представляют репрезентативный результат, представляющий 10 независимых экспериментов (5 в клетках HeLa и 5 в HEK293T).

Инкубация экспрессирующих TLR4-Cer клеток в присутствии флуоресцентно меченого пептида BTX-4BB вызывала как снижение модуляции флуоресценции донора, так и возрастание фазового сдвига между пиками возбуждения и эмиссии, что свидетельствует о снижении времени жизни флуоресценции донора вследствие FRET (Рис. 42е). Эти наблюдения указали на наличие прямого взаимодействия донора (TIR

домена TLR4) и акцептора (пептида 4BB) непосредственно в клетках (Toshchakov et al., 2011).

4.3.1 Связывание TLR4 и TLR2 флуоресцентно мечеными БП in situ в клеточной модели

В следующей серии экспериментов было произведено систематическое сравнение эффективности тушения флуоресценции TLR4-Cer и TLR2-Cer пептидами, происходящими из TIR домена TLR4 и способными ингибировать рецепторную функцию TLR4. Было изучено влияние 5 флуоресцентно меченых пептидов: 4R1, 4R3, 4BB, 4R9 и 4 α E, каждый из которых проявлял выраженные ингибиторные свойства в отношении TLR4, как подробно описано выше в разделе 4.2.1. Помимо пептида 4BB, выраженной способностью тушить флуоресценцию TLR4-Cer обладали пептиды 4R1 и 4 α E, тогда как пептиды 4R3 и 4R9 не вызывали статистически достоверных изменений (Рис. 43а и б). Пептид 4R1, в отличие от других исследованных пептидов, связывал не только TLR4, но и TLR2 (Рис. 43в).

Расположение регионов, представленных ингибиторными пептидами, связывающими TLR4, таково, что пептиды 4BB и 4 α E представляют регионы, расположенные на противоположных сторонах TIR домена, а 4R1 занимает промежуточную позицию между ними (Рис. 43г). На основании этих наблюдений были сделаны предположения, что пептиды 4BB и 4 α E представляют сайты, ответственные за сигнал-инициирующую димеризацию TIR доменов TLR4, и что образующийся димер асимметричен и сформирован взаимодействием структурных элементов, расположенных вблизи противоположно расположенных краевых тяжей β -листа (Toshchakov et al., 2011). Основной вклад в такое взаимодействие, с одной стороны, вносится петлёй BB с возможным минорным участием петли AB, которые взаимодействует с участком, представленным α -спиралью E

второго TIR домена димера. Такой тип функционального взаимодействия рецепторных TIR доменов является в настоящее время наиболее широко признанным, поскольку подтвердился последующими структурно-биологическими исследованиями, а также выполненными нашей группой скринингами пептидных библиотек других TIR доменов (Clabbers et al., 2021; Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020; Ve et al., 2017)

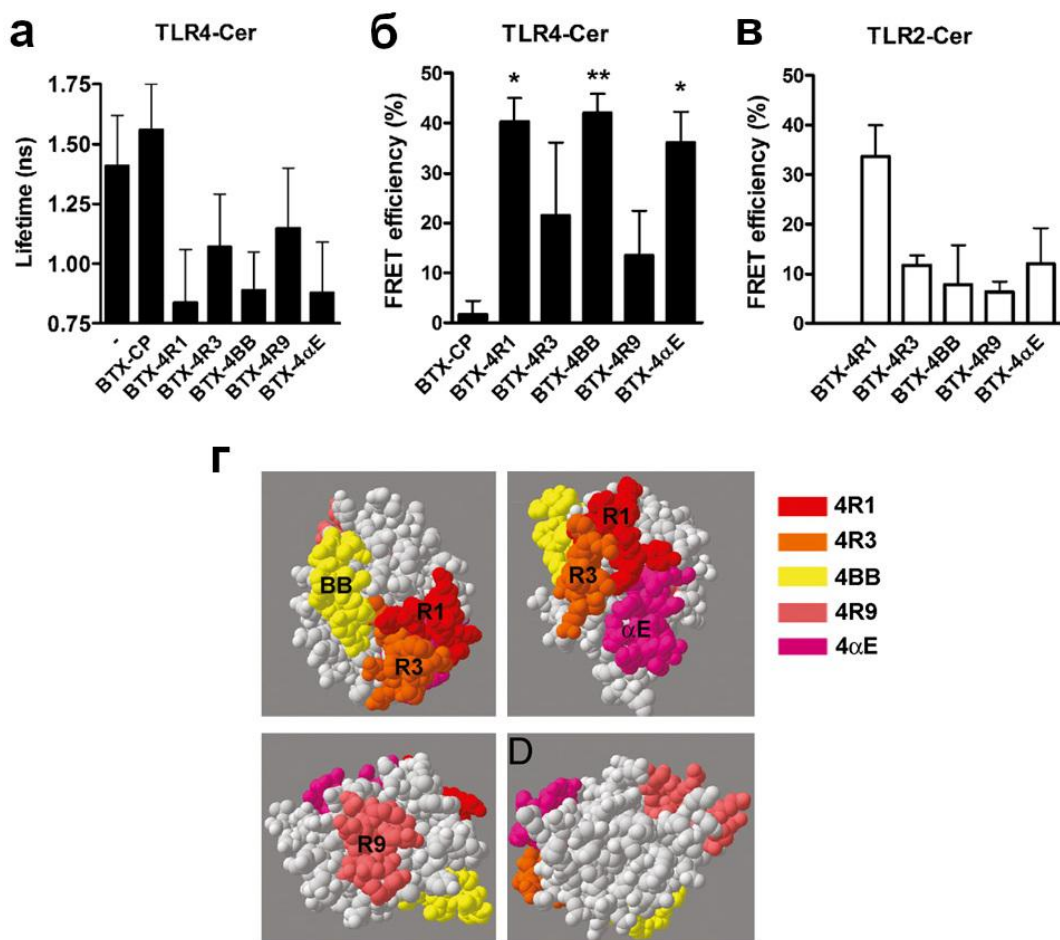


Рисунок 43 — Влияние флуоресцентно меченых, ингибиторных пептидов, происходящих из TIR домена TLR4, на время жизни флуоресценции TLR4-Cer (а) и на эффективность Фёрстеровского переноса энергии между пептидами и TLR4-Cer (б) или TLR2-Cer (в) (Toshchakov et al., 2011)

а – время затухания флуоресценции экспрессируемого в клетках HeLa TLR4-Cer в присутствии ингибиторных пептидов, конъюгированных с Bodipy-TMR-X. Клетки

инкубировали в присутствии флуоресцентно меченых пептидов (40 мкМ) в течение часа и фиксировали. Не ингибирующий пептид BTX-CP использовался в качестве контрольного. Время жизни флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре K2 (ISS, Champaign, IL), сопряжённом с флуоресцентным микроскопом (Axiovert TV130, Zeiss).

б – пептиды BTX-4R1, BTX-4BB и BTX-4 α E вызывали Фёрстеровское тушение флуоресценции TLR4-Cer. Одной и двумя звёздочками помечены данные, отличающиеся от контрольной группы с вероятностью * $p > 0.05$ и ** $p > 0.01$

в – ингибиторные пептиды, происходящие из TIR домена TLR4, за исключением пептида BTX-4R1, не вызывали значимого тушения флуоресценции TLR2-Cer.

г – структурная модель TIR домена TLR4, показывающая положение ингибиторных пептидов, происходящих из TIR домена TLR4.

Другое наблюдение, которое можно сделать, анализируя расположение ингибирующих последовательностей на поверхности TIR домена, заключается в том, что ингибирующий пептид, не связывающийся с TLR4 (пептид 4R9), расположен отдельно от вероятных сайтов димеризации TIR доменов рецептора (Рис. 43г). На основании этого наблюдения было предложено, что пептид 4R9 связывает адаптерный белок. Это предположение также было позднее подтверждено экспериментально. В частности, методом дот-блоттинга было показано, что 4R9 связывает TIR домен адаптерного белка TIRAP (Piao, Ru, et al., 2013a). Также было показано, что пептид, происходящий из структурно гомологичного участка TIR домена TLR2, способен связывать TIRAP и блокировать функцию рецептора аналогично пептиду 4R9 (Piao et al., 2015).

4.3.2 Демонстрация специфичности TIR-пептидного связывания методами микроскопии времени жизни флуоресценции (FLIM)

Описанные в предыдущем разделе эксперименты продемонстрировали снижение среднего времени жизни флуоресценции при обработке экспрессирующих TLR4-Cer клеток некоторыми флуоресцентно-мечеными,

TLR4-блокирующими пептидами. Детекция тушения, однако, осуществлялась по интегральному свечению выращенных на слайдах клеток, что затрудняет интерпретацию полученных данных. Микроскопия времени жизни флуоресценции (FLIM (от английского Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy)) позволяет более надёжную интерпретацию данных FRET по связыванию биологических макромолекул в клеточных системах. С целью верификации данных, полученных методом пространственно неразрешенной спектроскопии, а также для разработки способов количественной оценки белок-пептидного связывания в клетках, нами была применена микроскопия времени жизни флуоресценции. В начальных экспериментах использовался FLIM в частотном домене (fdFLIM (frequency-domain FLIM)). Этот подход использует синусоидно-модулируемое по амплитуде возбуждение флуоресценции с частотой, варьируемой в диапазоне до сотен МГц. Анализируемыми параметрами являются модуляция интенсивности эмиссии флуоресценции и фазовый сдвиг между пиками интенсивности возбуждающего и эмитируемого света. Теория и методические подходы к fdFLIM описаны в литературе (Borst & Visser, 2010; Lakowicz, 2006; Malacrida et al., 2025) и не являлись предметом настоящего диссертационного исследования.

Примеры анализа флуоресцентных сигналов методом fdFLIM с применением фазорных диаграмм представлены на рисунке 44. Принципы анализа фазорных диаграмм описаны в литературе (Digman et al., 2008; Malacrida et al., 2025; Szmecinski et al., 2014). В частности, положение фазоров вблизи универсального полукруга фазорной диаграммы, как можно наблюдать на фазорной диаграмме флуоресценции экспрессируемого в клетках TLR2-Cer (Рис. 44а), свидетельствует об однокомпонентном характере затухания флуоресценции. Расчеты, подробно приведённые в нашей публикации (Szmecinski et al., 2014), показали, что характерное время жизни флуоресценции экспрессируемого в клетках Cer в отсутствие тушения составляет ~ 2,8 нс.

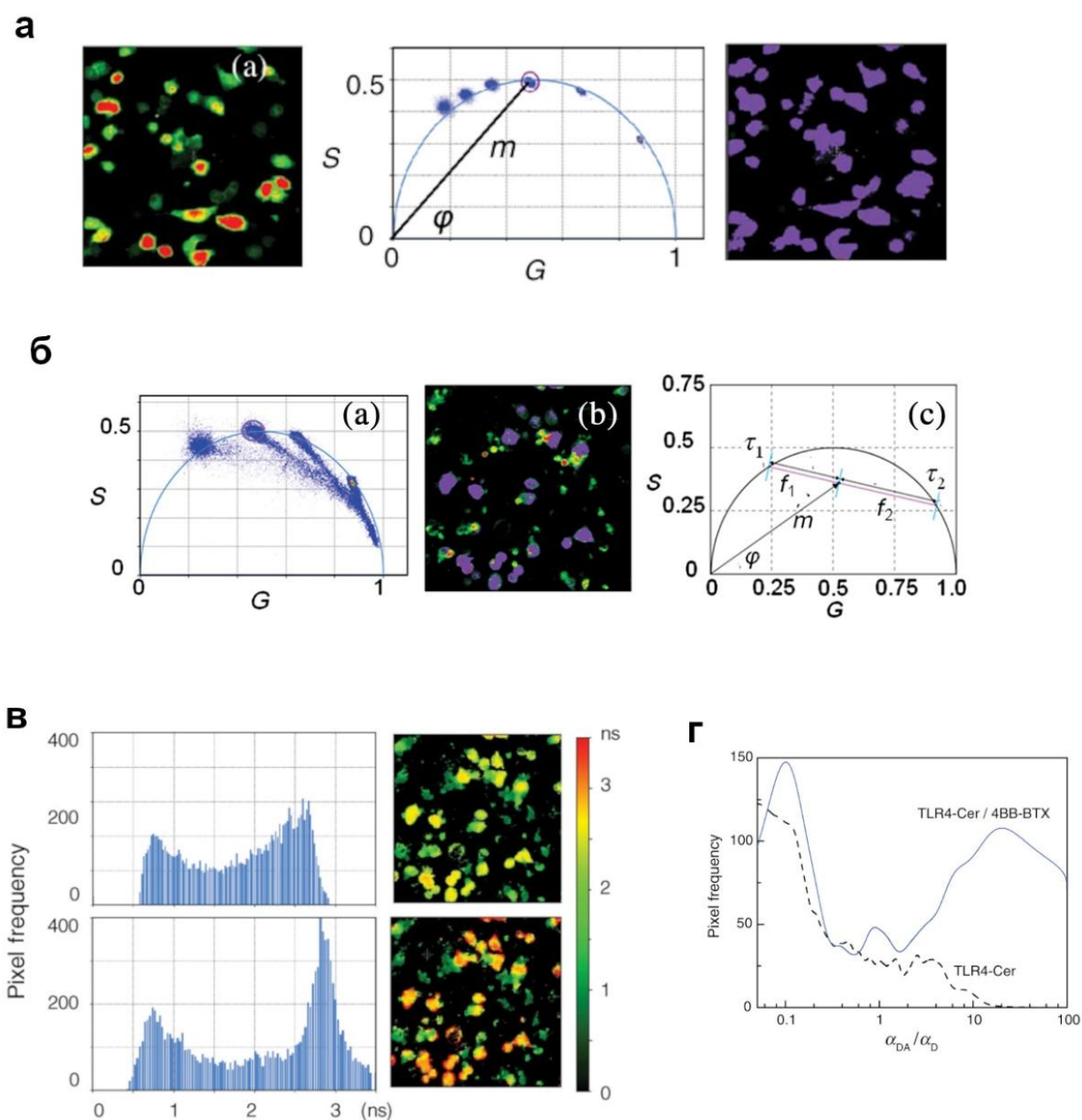


Рисунок 44 — Анализ внутриклеточных взаимодействий TIR доменов с блокирующими пептидами методом микроскопии времени затухания флуоресценции (Szmackinski et al., 2014)

а – флуоресценция экспрессируемого в клетках TLR2-Cer представляет собой пример однокомпонентного затухания флуоресценции. Левая панель представляет флуоресцентное изображение HeLa клеток, экспрессирующих TLR2-Cer (интенсивность флуоресценции представлена искусственной цветовой шкалой). В середине показаны соответствующие изображению многочастотные фазорные диаграммы для частот

модуляции возбуждения флуоресценции 20, 40, 60, 80, 100 и 120 МГц (фазоры отдельных пикселей образуют концентрические области, которые располагаются вблизи универсального полукруга и смещаются влево с возрастанием частоты модуляции). Изображение справа показывает пиксели, соответствующие фазорам, отмеченным фиолетовым кружком на фазорной диаграмме в середине панели, полученной при частоте модуляции возбуждения 60 МГц. Время жизни флуоресценции измеряли и анализировали, используя FLIM систему Альба 5 с пакетом программного обеспечения VistaVision Suite (v. 204) (ISS, Champaign, IL).

б – затухание флуоресценции TLR4-Cer, экспрессируемого в инкубируемых в присутствии BTX-4BB клетках HeLa, свидетельствует о двухкомпонентной природе флуоресцентного сигнала. На левом графике показаны фазорные диаграммы для частот модуляции возбуждения флуоресценции в 20, 40, 60 и 100 МГц. Во FLIM изображении, расположенном правее, фиолетовым отмечены пиксели, соответствующие фазорам, отмеченным кружком на фазорной диаграмме. График справа показывает принцип интерпретации фазорной диаграммы FLIM-изображений при биэкспоненциальном затухании флуоресценции (Szmanski et al., 2014).

в – гетерогенность среднего времени затухания флуоресценции клеток, экспрессирующих TLR4-Cer и инкубированных в присутствии BTX-4BB (40 мкМ). Левые панели показывают гистограммы среднего времени жизни флуоресценции и FLIM-изображения без коррекции на автофлуоресценцию клеток (верхние панели) и гистограмму, скорректированную на присутствие автофлуоресценции клеток (нижние панели).

г – гистограмма амплитуд коротко- и долгоживущего компонента флуоресценции TLR4-Cer в изображениях клеток HeLa, инкубируемых в присутствии 40 мкМ пептида BTX-4BB (сплошная линия) и без него (пунктирная линия). Присутствие пептида BTX-4BB вызывает появление областей с преобладающим вкладом короткоживущего компонента. Сохранение областей, характеризующихся высоким вкладом долгоживущего компонента, объяснялось гетерогенностью эктопической экспрессии трансгена: в этих регионах клеток экспрессия TLR4-Cer была высока (Szmanski et al., 2014).

В случае многокомпонентного флуоресцентного сигнала, фазоры отдельных пикселей располагаются внутри универсального полукруга

фазорной диаграммы, причём при двухкомпонентном сигнале фазоры располагаются на линии, соединяющей положения фазоров отдельных компонентов (Рис. 44б (с)) (Malacrida et al., 2025; Szmackinski et al., 2014). Фазорная диаграмма флуоресценции TLR4-Cer в присутствии пептида BTX-4BB свидетельствует, в целом, о двухкомпонентном характере флуоресценции Cer: в этих условиях значительное число фазоров отдельных пикселей располагается внутри универсального полукруга вдоль отрезка, соединяющего области однокомпонентного затухания с временами жизни ~ 2.8 нс и 0,6–0,75 нс (Рис. 44б (а)). Очевидно, что долгоживущий компонент соответствует флуоресценции свободного, не связанного с акцептором Cer, тогда как короткоживущий компонент представляет флуоресценцию донор-акцепторной пары, появление которой обусловлено связыванием TIR домена TLR4 с пептидом 4BB. Линейное распределение положения фазоров отдельных пикселей изображения также указывает, что соотношение вкладов долго- и короткоживущего компонентов варьирует в различных клетках и в различных регионах клетки (Рис. 44б (b)).

Сравнительный анализ FLIM-изображений HeLa клеток, инкубируемых в присутствии пептида BTX-4BB и без него, показал, что присутствие пептида вызывает появление областей, характеризующихся значительно сниженным временем жизни флуоресценции, обусловленным тушением флуоресценции TLR4-Cer (Рис. 44г). Это наблюдение подтвердило полученные ранее данные, указывающие на прямое связывание пептида 4BB и TIR домена TLR4, и тем самым валидировало предложенную FRET-систему в сочетании с визуализацией тушения флуоресценции методами FLIM как эффективный метод детекции прямого TIR-пептидного связывания непосредственно в клетках. Предложенная FRET-FLIM-система использовалась нами в последующих исследованиях связывания ингибиторных пептидов пептидных библиотек TLR2, TLR9, TLR7 и TLR5 (Javmen et al., 2018, 2020, 2023; Piao et al., 2015).

4.3.3 Связывание TIR доменов ингибирующим пептидом библиотеки TIR домена TLR2

Скрининг ингибиторных свойств пептидной библиотеки, представляющей TIR домен TLR2, идентифицировал пептид 2R9 как мультиспецифический ингибитор TLR, способный, помимо TLR2, ингибировать TLR4, TLR7 и TLR9 (Рис. 15–17 и (Piao et al., 2015)). Мультиспецифический характер ингибирования пептидом 2R9, с одной стороны, мог быть следствием блокирования адаптерного белка общего для указанных рецепторов, а с другой стороны, происходить вследствие мультиспецифического связывания пептида с несколькими TIR доменами. Эти версии были оценены экспериментально, для чего было изучено связывание пептида 2R9 с TIR доменами, являющимися его потенциальными мишенями, методами FLIM.

Активированный TLR2 гетеродимеризуется с TLR1 или TLR6 и рекрутирует адаптерные белки TIRAP и MyD88 (Kawai et al., 2024). Были сконструированы экспрессионные векторы, кодирующие TIR домены различных TLR в связке с Cer, а также аналогичные векторы, кодирующие TIR домены адаптерных белков (Piao et al., 2015). Пептид 2R9 был конъюгирован с флуоресцентной меткой Bodipy-TMR-X (BTX), спектральные характеристики которой позволяют её использование в качестве акцептора во FRET-паре с Cer.

4.3.3.1 Анализ связывания ингибиторного пептида 2R9 с различными TIR доменами методами FLIM

В первой серии экспериментов изучали связывание 2R9 с TIR доменами TIRAP, TLR1 и MyD88. В предварительных экспериментах было установлено, что кривые затухания флуоресценции экспрессируемого в клетках Cer в условиях тушения флуоресценции достаточно хорошо аппроксимируются моделью двухкомпонентного экспоненциального

затухания с характеристическими временами жизни флуоресценции компонентов 2,80–2,98 и 0,6–0,9 нс. Поскольку время жизни долгоживущего компонента соответствует времени жизни свободного, экспрессируемого в клетках Cer, принималось, что долгоживущий компонент представляет флуоресценцию свободного, не связанного с акцептором Cer, тогда как быстрозатухающий компонент представляет флуоресценцию Cer, находящегося в комплексе с акцептором вследствие прямого TIR-пептидного связывания. Соотношение фракционных амплитуд коротко- и долгоживущего компонента (α_1/α_2), получаемое при аппроксимации кривых затухания, соответственно, принималось как отражение локального соотношения концентраций свободного и связанного с акцептором донора (Szmecinski et al., 2014).

Рисунок 45 представляет результаты анализа связывания пептида 2R9 с TIR доменами TIRAP, TLR1 и MyD88 методом микроскопии времени жизни флуоресценции. Левые панели рисунка показывают FLIM-изображения клеток, экспрессирующих заданные TIR-Cer конструкции в присутствии различных концентраций пептида 2R9, конъюгированного с флуоресцентным красителем BTX (Рис. 45а). Изображения представляют фракционную амплитуду короткоживущего компонента α_1 . Этот параметр отражает содержание связанных донор-акцепторных пар, нормированное на общее содержание молекул донора флуоресценции. 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. 45а и б). Влияние BTX-2R9 на флуоресценцию MyD88-Cer было минимальным (Рис. 45а и б). 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. 45в).

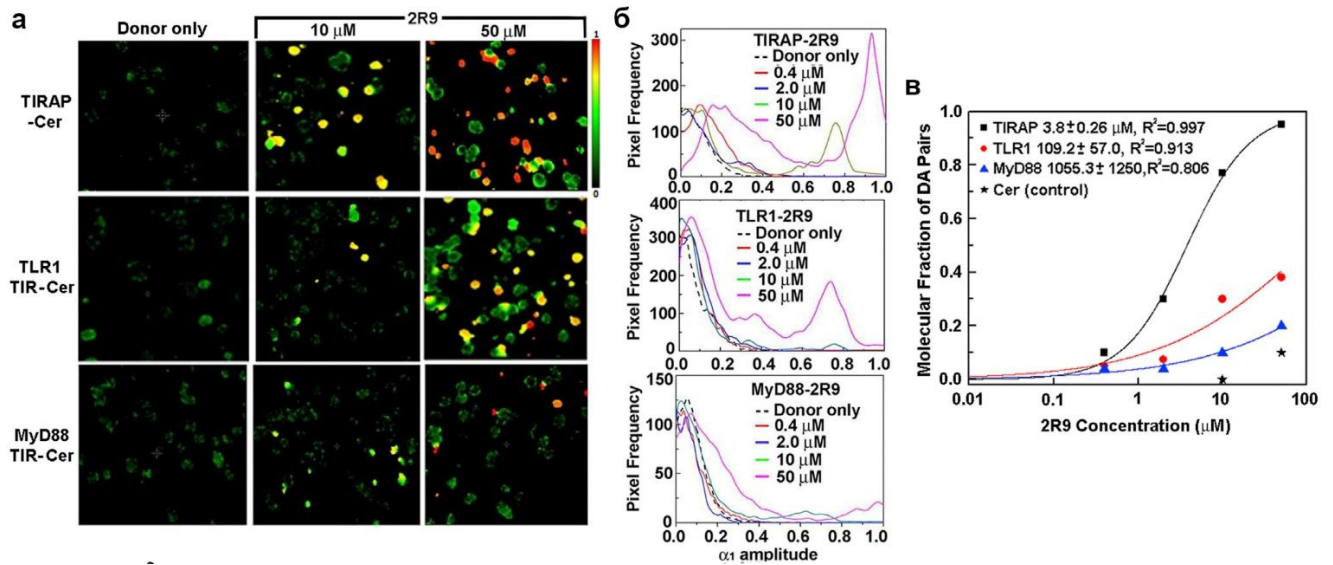


Рисунок 45 — Анализ взаимодействия пептида 2R9 с экспрессируемыми в клетках TIR доменами взаимодействующих с активированным TLR2 белков методом FLIM (Piao et al., 2015)

а – FLIM изображения клеток, экспрессирующих TIRAP-Cer, TLR1-Cer и MyD88-Cer, в присутствии различных концентраций пептида 2R9 и без пептида. Затухание флуоресценции анализировали, используя модель двухкомпонентного затухания с временами жизни компонентов $\tau_1=0,9$ нс и $\tau_2=2,96$ нс. Изображения показывают фракционную амплитуду α_1 короткоживущего компонента флуоресценции. Изображения получали и анализировали, используя FLIM систему Альба 5 с пакетом программного обеспечения VistaVision Suite (v. 204) (ISS, Champaign, IL).

б – гистограмма встречаемости пикселей с различной представленностью короткоживущего компонента флуоресценции Cer в HeLa клетках, экспрессирующих TIRAP-Cer, TLR1-Cer и MyD88-Cer, в присутствии различных концентраций BTX-2R9.

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

Зависимость фракционной амплитуды короткоживущего компонента флуоресценции Cer в различных TIR-Cer конструкциях от концентрации BTX-2R9 показана на рисунке 45в. BTX-2R9 вызывал тушение флуоресценции TIRAP-Cer с кажущейся константой связывания $3,8 \pm 0,26$ мкМ. Кажущиеся константы связывания BTX-2R9 с TLR1- и MyD88-Cer были $109,2 \pm 57,0$ и $1055,3 \pm 1250,0$ мкМ, соответственно (Рис. 45в). Следует, однако, подчеркнуть, что данные константы связывания рассчитаны исходя из внеклеточной концентрации добавленного в среду инкубации клеток акцептора, которая не отражает локальную концентрацию акцептора в цитоплазме клеток. Вместе с тем, несмотря на условный характер величин кажущихся констант связывания, полученные данные убедительно показывают, что основной мишенью пептида 2R9 является TIR домен адаптера TIRAP, а связывание пептида с TIR доменом TLR1 может играть лишь минорную, вспомогательную роль в ингибировании.

Поскольку пептид 2R9, помимо TIR домена TIRAP, связывал и TLR1, а также ингибировал и TLR4, TLR7 и TLR9, изучили связывание этого пептида с TIR доменами других ингибируемых пептидом рецепторов. Вследствие низкой экспрессии полноразмерных TLR в клетках, при изучении связывания TLR1, TLR7 и TLR9 использовали варианты трансгенов, лишенные эктодоменов, но сохраняющие трансмембранный участок и TIR домен. В этих опытах было замечено, что TLR7 особенно быстро элиминируется после трансфекции, вследствие чего экспрессия трансгена не регистрировалась на второй день после трансфекции клеток. Вследствие этого обстоятельства, инкубирование TLR7-экспрессирующих клеток с пептидом и регистрацию флуоресценции проводили на следующий день после трансфекции, а не на второй день, как для остальных трансгенов.

Анализ FLIM-изображений клеток HeLa, экспрессирующих различные трансгены и инкубируемых в течение часа в присутствии пептида 2R9, показал, что, помимо TIR домена адаптера TIRAP, пептид 2R9 связывает и

TIR домены TLR4 и TLR7, но не связывает TLR9 (Рис. 46). Следует отметить, однако, что связывание пептида с TLR4 и TLR7 было значительно меньше его связывания с TIR доменом TIRAP (Рис. 46а–в). Так, кажущиеся константы связывания 2R9 с TLR4 и TLR7 были приблизительно на порядок выше кажущейся константы связывания с TIRAP (Рис. 46в). Данные FLIM показали отсутствие значимого связывания пептида 2R9 с TIR доменом TLR9 (Рис. 46в). Последнее утверждение было независимо подтверждено и данными, полученными методом дот-блоттинга (Рис. 46г).

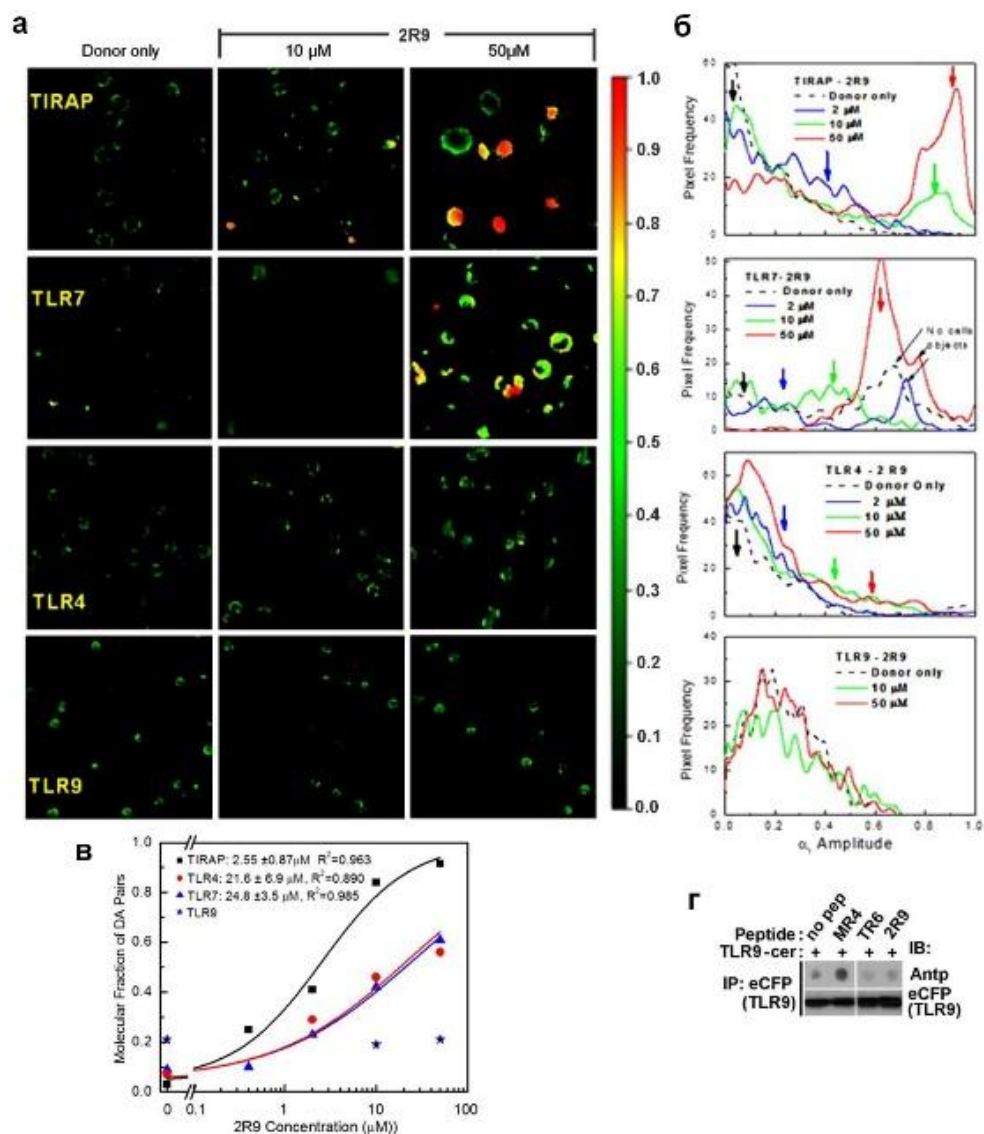


Рисунок 46 — Анализ взаимодействия пептида 2R9 с TIR доменами различных TLRs (Piao et al., 2015)

а – FLIM изображения клеток, экспрессирующих TIRAP-Cer, TLR7-Cer, TLR4-Cer и TLR9-Cer в присутствии различных концентраций пептида BTX-2R9. Затухание флуоресценции анализировали, используя модель двухкомпонентной природы флуоресценции с временами жизни компонентов $\tau_1=0,9$ нс и $\tau_2=2,96$ нс. Изображения показывают фракционную амплитуду α_1 короткоживущего компонента флуоресценции. Изображения получали и анализировали, используя FLIM систему Альба 5 с пакетом программного обеспечения VistaVision Suite (v. 204) (ISS, Champaign, IL).

б – распределение частот встречаемости пикселей с различной представленностью короткоживущего компонента флуоресценции Cer в HeLa клетках, экспрессирующих TIRAP-Cer, TLR1-Cer и MyD88-Cer в присутствии различных концентраций BTX-2R9.

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

4.3.3.2 Характеристика бинарного связывания TIR домена адаптерного белка TIRAP с пептидом 2R9

Установив методами FLIM, что основной мишенью пептида 2R9 в клетках является TIRAP, аффинность и кинетику бинарного взаимодействия в этой паре изучили методами АФ и ППР, используя рекомбинантный TIR домен мышинового TIRAP в качестве мишени. В качестве контроля на специфичность связывания BTX-2R9 титровали бычьим сывороточным альбумином (BSA). Измеряли анизотропию флуоресценции BTX. Результаты измерений показаны на рисунке 47а. Титрование пептида BTX-2R9 TIR доменом TIRAP вызывало дозозависимое увеличение анизотропии флуоресценции BTX, тогда как добавление TIR домена TIRAP к не связывающему TIRAP пептиду BTX-2R1 не вызывало аналогичного увеличения анизотропии (Рис. 47а). Титрование пептида BTX-2R9 BSA также вызывало увеличение анизотропии флуоресценции пептида, однако в сравнении с TIRAP-TIR такое увеличение

наблюдалось при значительно больших концентрациях BSA (Рис. 47а). Аппроксимация данных титрования логистической функцией оценивала кажущуюся константу связывания в паре 2R9-TIRAP в ~ 40 нМ, тогда как в паре 2R9-BSA соответствующая оценка была почти в 40 раз выше и составляла $\sim 1,5$ мкМ (Рис. 47а) (Piao et al., 2015).

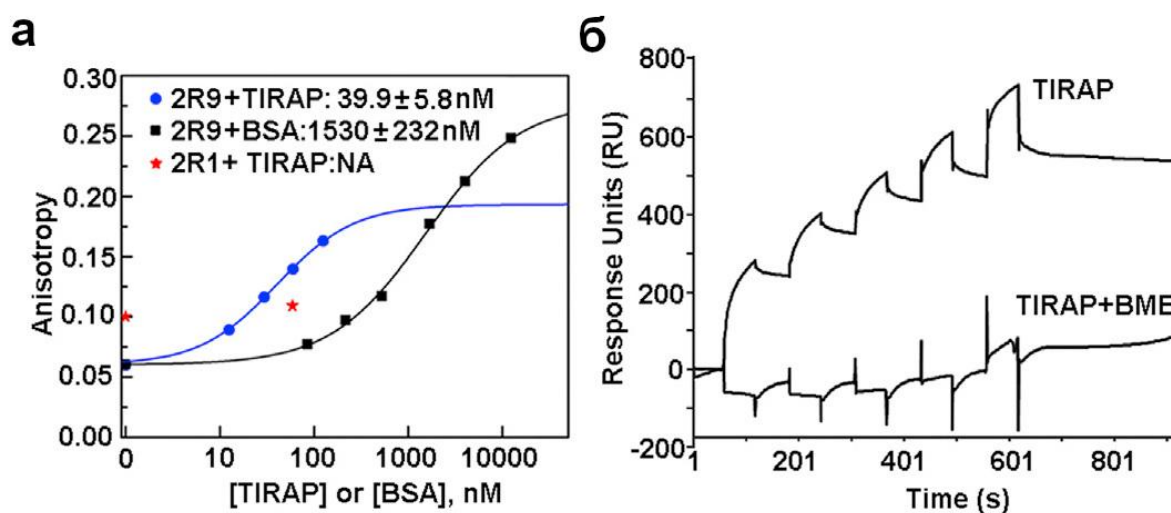


Рисунок 47 — Анализ взаимодействия пептида 2R9 с рекомбинантным TIR доменом белка TIRAP (Piao et al., 2015)

а – анизотропия флуоресценции меченных BTX пептидов BTX-2R9 и BTX-2R1 в присутствии различных концентраций рекомбинантного TIRAP или BSA. Флуоресцентно меченные пептиды в исходной концентрации 50 нМ титровали рекомбинантным TIR доменом TIRAP или BSA. Верхний предел АФ в присутствии насыщающих концентраций TIRAP оценивали исходя из соотношения размеров белковых мишеней, BSA и TIRAP.

б – ППР сенсограмма взаимодействия иммобилизованного пептида 2R9 с рекомбинантным TIR доменом адаптера TIRAP. В контрольной ячейке иммобилизовали Antp вектор. Рекомбинантный TIRAP пассивировали в концентрациях 21, 43, 86, 178 и 344 мкМ, чередуя с периодами промывки буфером. Сенсограммы получали в присутствии или без β -меркаптоэтанола (BME). На графике представлена разность отклика в тестовой и контрольной ячейке.

Таким образом, эксперименты *in vitro* с рекомбинантным белком подтвердили высокое сродство связывания в паре 2R9-TIRAP, наблюдаемое в клетках, однако кажущаяся константа связывания в бинарной паре пептид-белок (~40 нМ) была приблизительно на 2 порядка ниже кажущейся константы связывания в клеточной системе (2–4 мкМ) (Рис. 45–47). Такое несоответствие объясняется различиями между внеклеточной и внутриклеточной концентрациями проникающего пептида, а также вероятным неспецифическим и нефункциональным связыванием пептида с протеомом клетки.

Кинетику связывания 2R9 с TIRAP-TIR изучали методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (Piao et al., 2015). В этом исследовании пептид иммобилизовался на поверхности измерительной ячейки, через которую пассивировался рекомбинантный TIRAP-TIR. Поверхность контрольной ячейки покрывалась пептидом *Antp*, представляющим собой проникающую последовательность пептида 2R9. Полученные сенсограммы подтвердили высокое сродство взаимодействия в паре 2R9-TIRAP (Рис. 47б). Взаимодействие 2R9-TIRAP, однако, ожидаемо разрушалось в присутствии денатурирующих концентраций β-меркаптоэтанола (Рис. 47б). Также полученные сенсограммы демонстрируют относительно высокую скорость ассоциации комплекса, сочетающуюся с низкой скоростью диссоциации (Рис. 47б), что характерно для взаимодействия протяженных биомолекул.

Таким образом, исследования методами АФ и ППР, использующие рекомбинантный белок, подтвердили полученные в клеточной системе данные, свидетельствующие о высокой аффинности связывания в паре 2R9-TIRAP. Кроме того, методами АФ было обнаружено низкоаффинное связывание пептида 2R9 с альбумином.

4.3.4 Специфичность связывания TIR доменов блокирующими пептидами библиотеки TIR домена TLR9

Скрининг библиотеки блокирующих пептидов TIR домена TLR9 на способность блокировать функцию TLR9 выявил несколько ингибиторов, наиболее эффективными из которых были пептиды 9R34, 9R34-ΔN (версия пептида 9R34 без трёх N-концевых аминокислот блокирующей части) и пептид 9R11 (Рис. 20 и 22, (Javmen et al., 2018)). Описанный выше метод FRET-FLIM применили для идентификации мишеней, связываемых пептидами 9R34-ΔN и 9R11. В этой серии экспериментов (как и в последующих сериях, которые будут описаны ниже в настоящей диссертационной работе) в качестве пептидной флуоресцентной метки использовали краситель цианин-3 (Cy3). Cy3 имеет спектры поглощения и эмиссии близкие к таковым BTX и может быть использован во FRET паре с Cer в качестве замены BTX. Изучали связывание пептидов 9R34-ΔN и 9R11 с TIR доменами первичного сигнального комплекса, собираемого при активации TLR9: TIR доменами TLR9, TIRAP и MyD88. В качестве негативного контроля на связывание использовали не конъюгированный с TIR доменом Cer, а также конструкции TLR2-Cer и TLR4-Cer, описанные ранее (Toshchakov et al., 2011). В качестве контрольной связывающейся пептид-TIR пары использовали пару 2R9-TIRAP (Piao et al., 2015).

Инкубация клеток HeLa, экспрессирующих TIRAP-Cer, в присутствии Cy3-2R9 вызывала значимое тушение флуоресценции Cer (Рис. 48а, б и в), что подтвердило как полученные нами ранее данные по связыванию TIR домена TIRAP с пептидом 2R9, так и функциональность Cy3 в качестве акцептора флуоресценции Cer в нашей модели. Пептид Cy3-9R34-ΔN вызывал выраженное тушение флуоресценции Cer конъюгированного с TIR доменом TLR9, причём заметный эффект наблюдался уже при меньшей из использовавшихся концентраций акцептора (2,5 мкМ) (Рис. 48а-в). Пептид Cy3-9R34-ΔN также тушил флуоресценцию конструкции TIRAP-Cer, однако в этой паре эффективность тушения была несколько меньше таковой, характерной для пары Cy3-9R34-ΔN/TLR9-TIR (Рис.48в). Важно отметить,

что анализ FLIM изображений показал, что пептид 9R34- Δ N не связывает ни TIR домены MyD88, TLR2 или TLR4, ни неконъюгированный с TIR доменом Cer (Рис.48а-в).

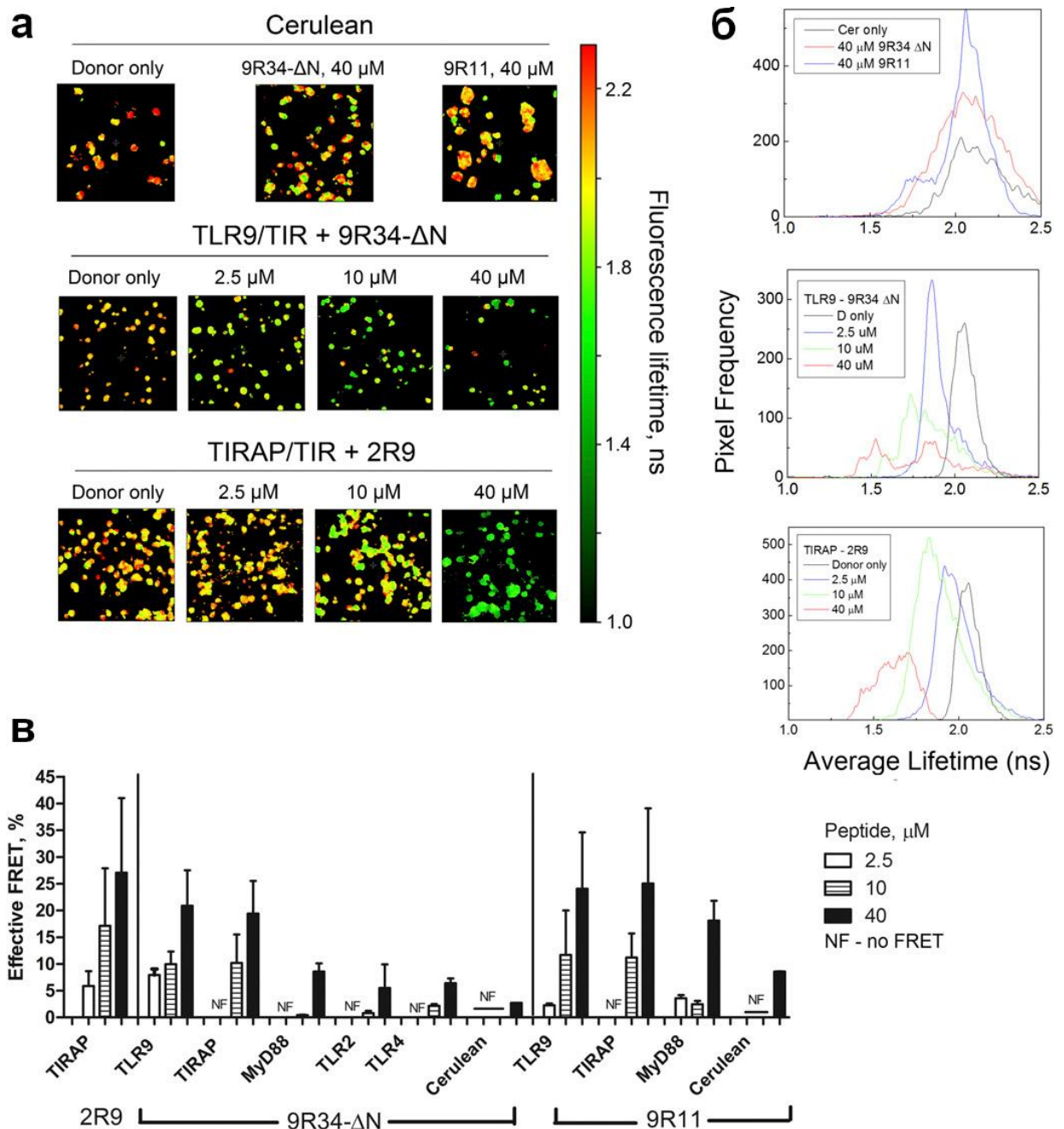


Рисунок 48 — Анализ взаимодействия ингибиторных пептидов библиотеки TLR9 с TIR доменами белков, участвующих в передаче сигнала Толл-подобных рецепторов, методом FLIM (Javmen et al., 2018)

а – FLIM-изображения клеток, экспрессирующих не конъюгированный с TIR доменом Cer (верхний ряд изображений), Cer конъюгированный с TIR доменом TLR9 (средний ряд) и Cer конъюгированный с TIR доменом TIRAP (нижний ряд), в присутствии различных концентраций указанных пептидов. Перед фиксацией слайдов клетки инкубировали 1 час в присутствии указанных концентраций блокирующих пептидов, меченных флуоресцентным красителем Cy3. Изображения попиксельно представляют среднее время затухания флуоресценции Cer согласно приведённой цветовой шкале. Среднее время жизни флуоресценции рассчитывали, используя модель двухкомпонентного затухания с фиксированным временем жизни долгоживущего компонента $\tau_2=3,10$ нс. Изображения получали и анализировали, используя FLIM систему Альба 5 с пакетом программного обеспечения VistaVision Suite (v. 204) (ISS, Champaign, IL).

б – частота встречаемости пикселей с различным средним временем затухания флуоресценции в FLIM изображениях клеток, экспрессирующих указанные конъюгаты Cer и инкубированных в присутствии варьируемых концентраций флуоресцентно меченых блокирующих пептидов. Тушение флуоресценции донора выражается в общем смещении кривых влево.

в – эффективность Фёрстеровского переноса энергии в различных парах БП-TIR домен.

Пептид 9R11 вызывал тушение флуоресценции TIR домена рецептора-прототипа, аналогично пептиду 9R34- Δ N, а также связывал TIR домены обоих адаптеров: TIRAP и, в меньшей степени, MyD88 (Рис.48в). Таким образом, полученные данные показывают, что ингибиторные пептиды, включающие краевой тяж β -листа (пептид 9R34- Δ N) или прилегающие к противоположному краевому тяжу (пептид 9R11), обладают ингибиторными свойствами и связывают TIR домен прототипа. На основании этих наблюдений было сделано предположение о том, что димеризация TIR доменов рецепторов осуществляется за счёт взаимодействий регионов, расположенных в противоположных полусферах поверхности TIR доменов, а именно вблизи поверхностно расположенных, краевых тяжей

центрального β -листа (Javmen et al., 2018). Более подробно основания и следствия этой гипотезы будут рассмотрены в разделе 4.3.7.

4.3.5 Специфичность связывания TIR доменов блокирующими пептидами библиотеки TIR домена TLR7

Скрининг пептидной библиотеки TIR домена TLR7 идентифицировал 4 пептида (7R1, 7R6, 7R9 и 7R11), способных ингибировать TLR7 (Рис. 23 и 24, (Javmen et al., 2020)). Специфичность связывания двух наиболее эффективных из них изучалась методами FLIM. Сравнивалось связывание пептидов 7R9 и 7R11 с TIR доменами адаптерных белков TIRAP и MyD88. В экспериментах использовали описанную выше FRET-FLIM систему с пептидами, меченными флуоресцентным красителем Cy3. Клетки, транзитивно экспрессирующие TIRAP-Cer или MyD88-Cer, инкубировались в течение часа в присутствии 2,5, 10 и 40 мкМ Cy3-7R9 или Cy3-7R11 и фиксировались 4% параформальдегидом. Полученные слайды анализировали методом FLIM (Рис. 49), используя подход с импульсным возбуждением флуоресценции (Lakowicz, 2006). Пара TIRAP-Cer с пептидом Cy3-2R9 служила положительным контролем на присутствие FRET. Примеры полученных FLIM-изображений, а также результаты численного анализа всех данных, представлены на рисунке 49.

Инкубация экспрессирующих MyD88-Cer клеток в присутствии пептида Cy3-7R11 вызывала значительное снижение времени жизни флуоресценции Cer (Рис. 49а и б), причем снижение можно было отметить уже при минимальных из использовавшихся концентраций (Рис. 49в). Следует отметить, что пептид Cy3-7R11 также вызывал аналогичное тушение флуоресценции и TIRAP-Cer (Рис. 49в), однако не влиял на флуоресценцию белка Cer не конъюгированного с TIR доменом (Рис. 49). Полученные данные показывают, что сайт, представленный пептидом 7R11 (5-я α -спираль TIR домена TLR7), может связывать оба адаптера MyD88-зависимого сигнального пути.

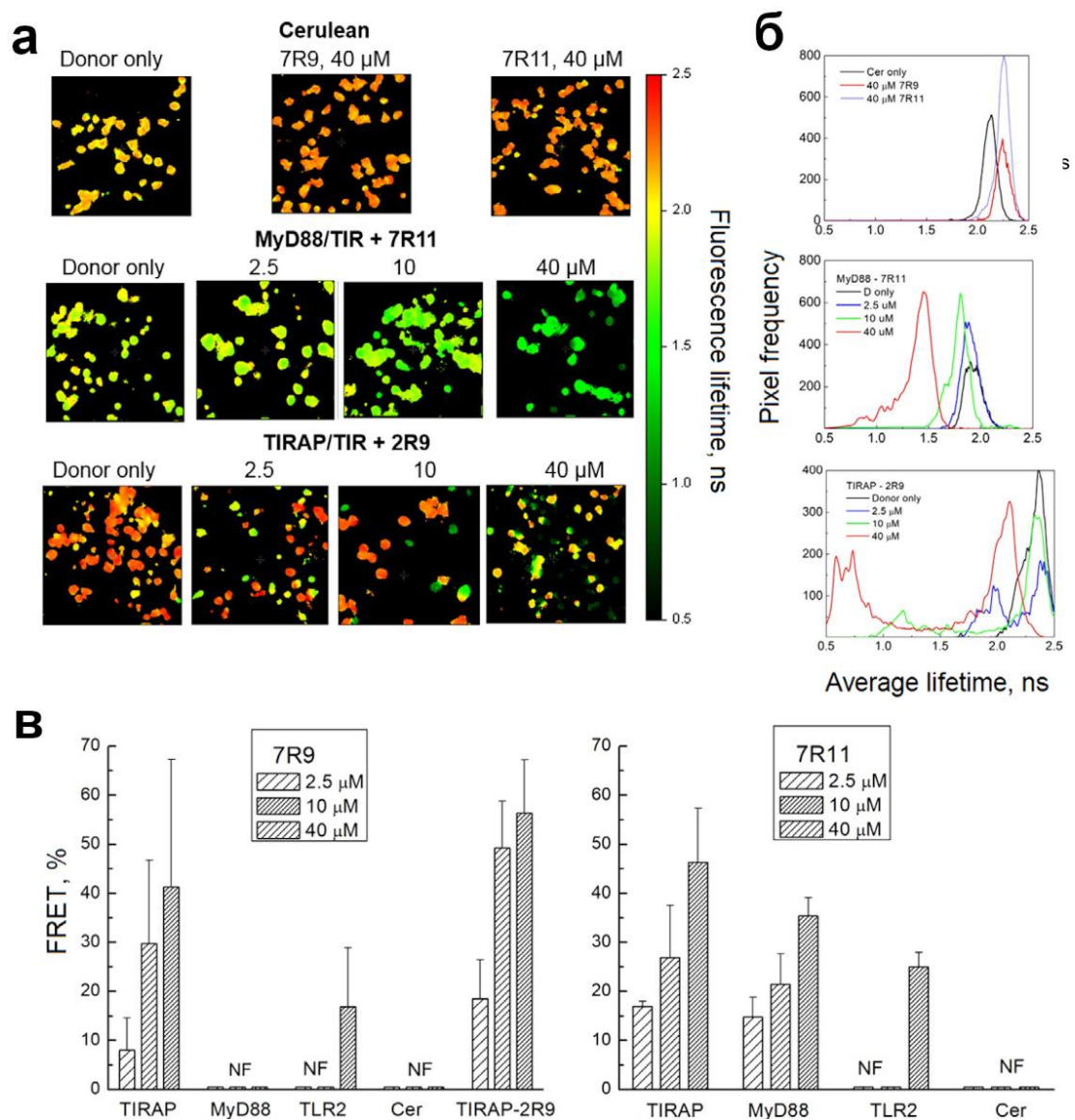


Рисунок 49 — Анализ взаимодействия ингибиторных пептидов библиотеки TLR7 с TIR доменами адаптерных белков MyD88-зависимого сигнального пути (Javmen et al., 2020)

a – FLIM-изображения клеток, экспрессирующих Cer не конъюгированный с TIR доменом (верхний ряд изображений), Cer конъюгированный с TIR доменом MyD88 (средний ряд) и Cer конъюгированный с TIR доменом TIRAP (нижний ряд), в присутствии различных концентраций пептидов. Перед фиксацией слайдов клетки инкубировали 1 час в присутствии указанных концентраций блокирующих пептидов, меченных флуоресцентным красителем Cy3. Изображения представляют среднее время затухания флуоресценции Cer согласно приведённой цветовой шкале. Изображения

получали и анализировали, используя FLIM систему Альба 5 с пакетом программного обеспечения VistaVision Suite, используя импульсную подсветку (v. 204) (ISS, Champaign, IL).

б – частота встречаемости пикселей с различным средним временем затухания флуоресценции в FLIM изображениях клеток, экспрессирующих указанные конъюгаты Cer и инкубированных в присутствии варьируемых концентраций флуоресцентно меченых БП. Тушение флуоресценции донора выражается в общем смещении кривых влево.

в – эффективность Фёрстеровского переноса энергии в различных БП-TIR парах.

Пептид Су3-7R9 вызывал тушение флуоресценции Cer в конструкции TIRAP-Cer, однако аналогичных изменений флуоресценции конструкции MyD88-Cer не наблюдалось (Рис. 49в). Также не наблюдалось влияния этого пептида и на флуоресценцию Cer не конъюгированного с TIR доменом (Рис. 49в). Полученные данные показали, что наиболее вероятным механизмом действия обоих пептидов является связывание и секвестрирование адаптерных белков, участвующих в формировании сигнального комплекса при активации TLR7, что хорошо согласуется с мультиспецифическим действием этих пептидов в отношении различных TLR (Рис. 24 и (Javmen et al., 2020)). Как обсуждалось выше в разделе 4.2.2.4, оба пептида, как 7R9, так и 7R11, помимо TLR7, ингибировали и другие TLR, использующие MyD88-зависимый сигнальный путь, а именно TLR4, TLR2 и TLR9 (Рис. 24). Вместе с тем можно отметить и различия в связывании адаптеров пептидами 7R9 и 7R11: пептид 7R9 связывал TIRAP, но не MyD88, тогда как 7R11 связывал оба адаптера.

4.3.6 Специфичность связывания TIR доменов блокирующими пептидами библиотеки TIR домена TLR5

Наиболее эффективным ингибитором из числа пептидов библиотеки TIR домена TLR5 являлся пептид 5R667, который соответствует главной

спирали третьего спирального участка TIR домена (спираль C'') (Рис. 26). Пептид из структурно-гомологичного региона адаптера TIRAP (пептид TR667) показывал аналогичные ингибиторные свойства, ингибируя активность широкого спектра Толл-подобных рецепторов (Рис. 27, (Javmen et al., 2023)). Связывание обоих пептидов с TIR доменом TLR5, а также с TIR доменами адаптерных белков MyD88-зависимого сигнального пути, было изучено методами FLIM с использованием разработанной нами FRET системы. Инкубация клеток, экспрессирующих TIR домен TLR5 в связке с Cer в присутствии обоих исследуемых пептидов, меченных Cy3, вызывала дозозависимое тушение флуоресценции белковой метки, выражающееся как в снижении интенсивности флуоресценции, так и в увеличении скорости затухания флуоресценции (Рис. 50, Табл. 2). Важно отметить, что аналогичного тушения флуоресценции донора акцепторными пептидами не наблюдалось в клетках, экспрессирующих Cer не конъюгированный с TIR доменом (Рис. 50, Табл. 2), что подтвердило прямое связывания пептидов с TIR доменами.

Исследование взаимодействия пептидов 5R667 и TR667 с TIR доменами TIRAP и MyD88 показало, что оба пептида связывают TIR домены обоих адаптерных белков (Рис. 51, Табл. 2, (Javmen et al., 2023)). Следует, однако, отметить, что обусловленное связыванием тушение флуоресценции донора пептидами Cy3-5R667 и Cy3-TR667 было значительно менее выражено в сравнении с таковым, наблюдаемым в паре TIRAP-2R9 (Рис. 50–51, Табл. 2, (Javmen et al., 2023)). Такие различия в эффективности тушения, с одной стороны, могут объясняться различной геометрией пептид-TIR комплексов, что должно выражаться в различиях в дистанции между донором и акцептором флуоресценции в пептид-TIR комплексах и, соответственно, в различных эффективностях FRET. С другой стороны, отсутствие корреляции эффективности ингибирования передачи сигнала с эффективностью связывания пептида с отдельными TIR доменами может объясняться за счёт связывания пептида с

несколькими TIR-содержащими белками сигнального пути, что в целом усиливает наблюдаемое влияние пептида на эффективность передачи сигнала в сигнальной цепи. Обнаруженный в наших экспериментах мультиспецифический характер связывания пептидов 5R667 и TR667 с TIR доменами обоих адаптерных белков MyD88-зависимого сигнального пути хорошо согласуется с мультиспецифическим характером ингибирования этими пептидами TLRs, задействующих MyD88 (Рис. 27).

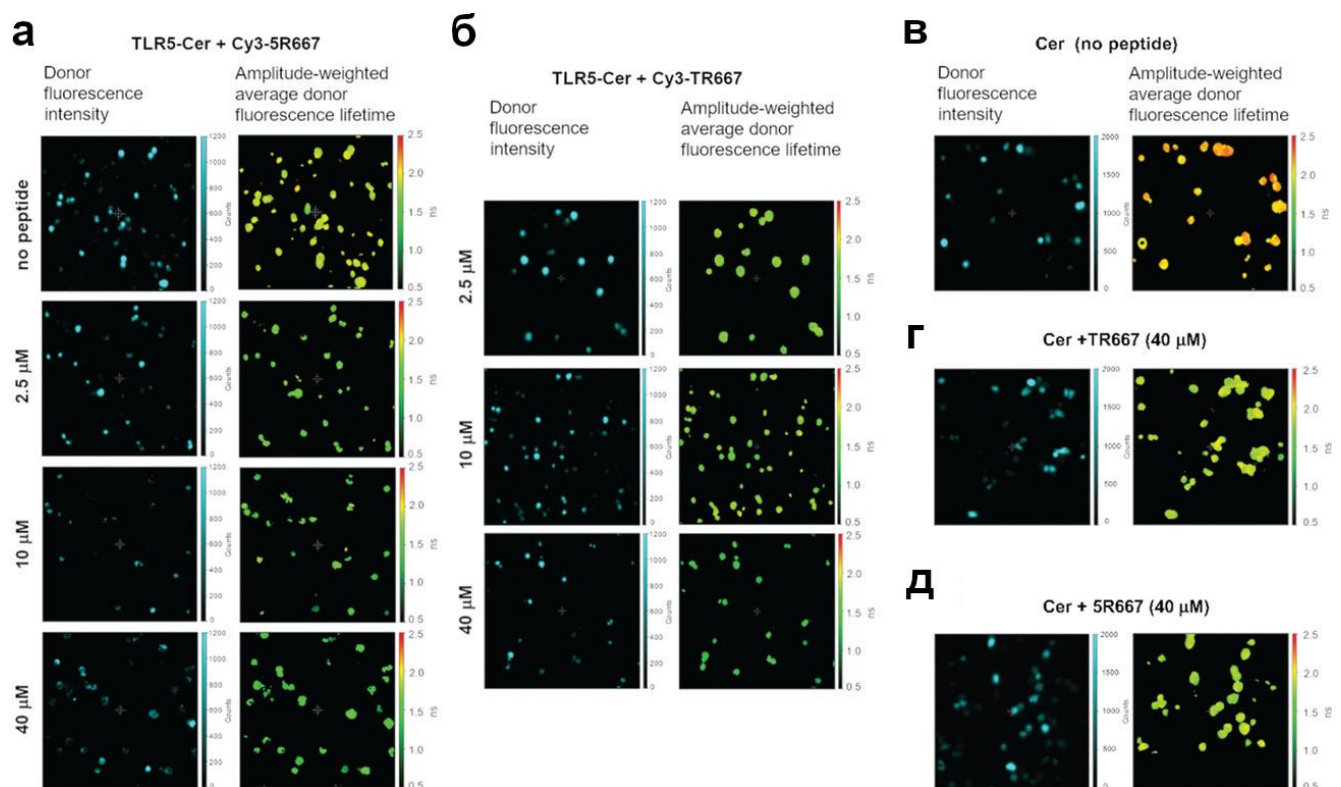


Рисунок 50 — Анализ взаимодействия пептидов 5R667 и TR667 с TIR доменом TLR5 (Javmen et al., 2023)

а – FLIM-изображения клеток, экспрессирующих Cer, конъюгированный с TIR доменом TLR5 (Cer-TLR5), и инкубированных в присутствии различных концентраций пептида Cy3-5R667. Изображения попиксельно показывают интенсивность флуоресценции донора при различных концентрациях акцептора (левое в каждой паре изображений), а также представляют соответствующее взвешенное по амплитуде среднее время затухания флуоресценции Cer согласно приведённой цветовой шкале.

Изображения получали и анализировали, используя FLIM систему Альба 5 с пакетом программного обеспечения VistaVision Suite (v. 204) (ISS, Champaign, IL), используя импульсное возбуждение флуоресценции.

б – FLIM-изображения клеток, экспрессирующих Cer, конъюгированный с TIR доменом TLR5, в присутствии различных концентраций пептида Cy3-TR667.

в–д – FLIM-изображения клеток, экспрессирующих не конъюгированный с TIR доменом Cer и инкубированных без пептида (**в**) или в присутствии 40 мкМ пептида Cy3-TR667 (**г**) или Cy3-5R667 (**д**).

С целью более глубокого понимания механизмов ингибирования TLR пептидами 5R667 и TR667 была проанализирована эволюционная сохранность белковых последовательностей, соответствующих этим пептидам (Javmen et al., 2023; Toshchakov & Neuwald, 2020). Методами биоинформатики были идентифицированы 205 уникальных последовательностей TIR доменов TLR5 позвоночных и 203 последовательности TIR домена адаптера TIRAP, представленных в открытых базах данных белковых последовательностей на время исследования (Toshchakov & Neuwald, 2020). Анализ идентифицированных последовательностей показал высокую эволюционную сохранность сегментов TIR доменов, соответствующих ингибиторным пептидам. Так, консенсусная последовательность региона, представленного пептидом 5R667, была $-W_9C_9L_6E_9A_9F_9(N_4/S_3)(Y_3/L_2/F_3)A_9Q_9(S_6/G_1)R_9-$ (частоты встречаемости отдельных остатков указаны подстрочными индексами в десятках процентов с округлением до меньшего. Например, W_9 означает, что триптофан в первой позиции встречается более чем в 90% последовательностей TIR доменов TLR5 хордовых). Аналогичная консенсусная последовательность TIR домена TIRAP: $-W_9C_9(K_5/R_2)Y_9Q_8M_9(H_5/L_4)Q_9A_8L_9(T_2/S_3/A_3)E_8-$. Анализируя приведённые характеристические последовательности, можно отметить, что позиции, соответствующие поверхностно расположенным аминокислотным остаткам

TIR доменов, демонстрируют особенно высокую степень эволюционной сохранности (аминокислотные остатки, формирующие поверхностно расположенную сторону α -спирали в структуре TIR домена, подчеркнуты в указанных выше консесусных последовательностях). Так, 3 из 4-х поверхностно расположенных аминокислотных остатков мотива TIRAP присутствуют более чем 90% последовательностей хордовых, тогда как остаток глутаминовой кислоты в последней позиции мотива присутствует в более чем 80% случаев. Аналогично, 3 из 4-х гомологичных остатка мотива TLR5 сохранены в более чем 90% последовательностей, а 8-я позиция мотива $-(Y_3/L_2/F_3)-$ представлена ароматической аминокислотой или лейцином в подавляющем большинстве обнаруженных последовательностей TLR5 (Javmen et al., 2023; Toshchakov & Neuwald, 2020). Более того, последовательности, соответствующие ингибиторным пептидам 5R667 и TR667, были характеристичны для TIR доменов соответствующих белков-прототипов и не встречались в TIR доменах других классов (Javmen et al., 2023; Toshchakov & Neuwald, 2020).

Рисунок 52 показывает локализацию сегментов TIR доменов, представленных ингибиторными пептидами, и выделяет аминокислотные остатки этих сегментов, боковые радикалы которых расположены поверхностно. Можно видеть, что ингибиторные сегменты образуют достаточно протяжённый участок поверхности TIR домена, способный осуществлять TIR-TIR взаимодействия (Рис. 52).

Представленные данные по связыванию пептидов 5R667 и TR667 с TIR доменами объясняют мультиспецифичность их действия в отношении различных TLR тем, что эти пептиды связывают и блокируют адаптерные белки MyD88-зависимого сигнального пути, а также показывают, что идентифицированные в скрининге ингибиторные пептиды происходят из эволюционно сохраненных сайтов взаимодействия TIR доменов белков-прототипов с TIR доменами адаптерных белков.

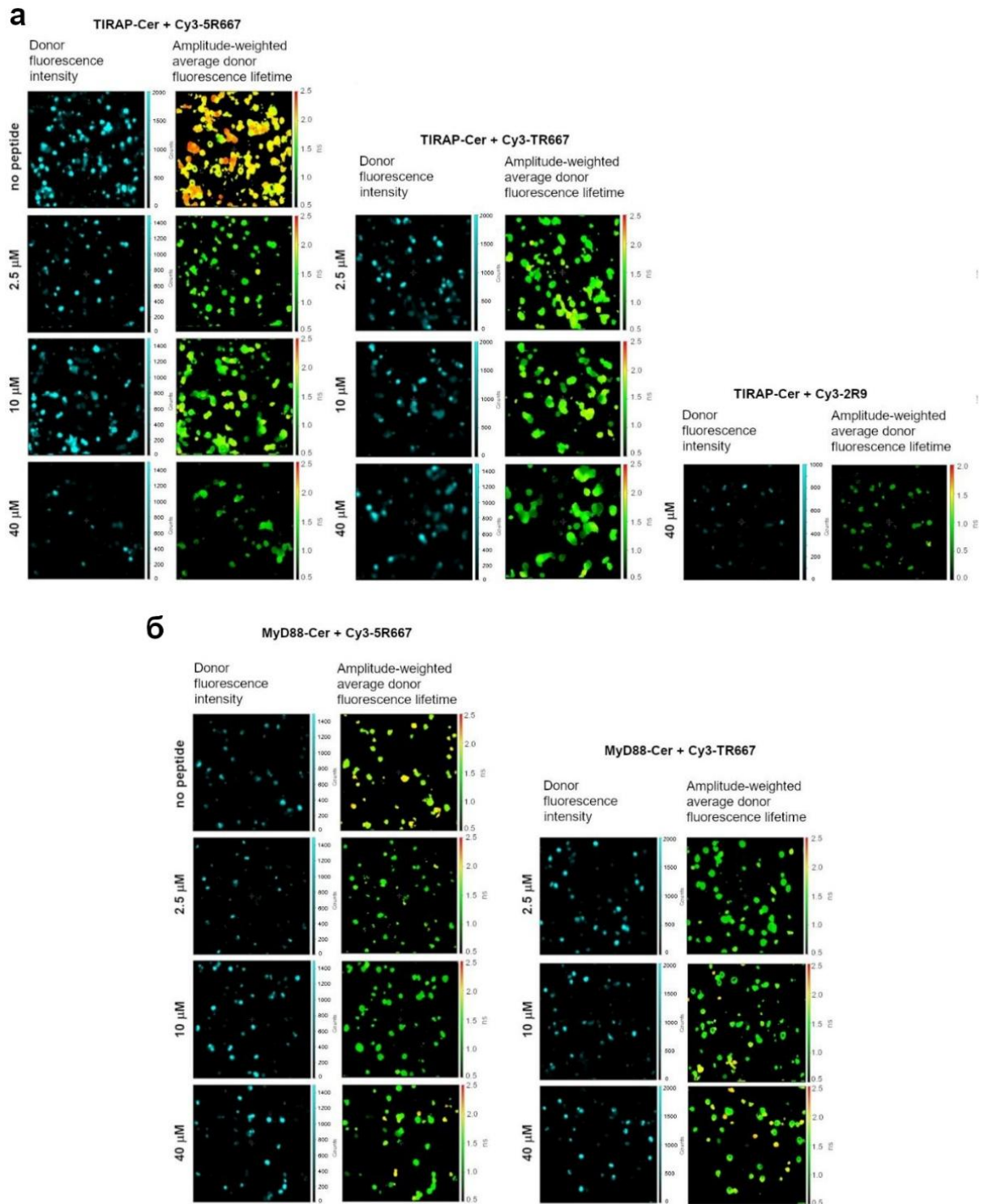


Рисунок 51 — Анализ взаимодействия пептидов 5R667 и TR667 с TIR доменами адаптеров (Javten et al., 2023)

a – FLIM-изображения клеток, экспрессирующих Cer, конъюгированный с TIR доменом TIRAP, и инкубированных в присутствии различных концентраций пептида Cy3-5R667, Cy3-TR667 и Cy3-2R9. Изображения попиксельно представляют взвешенное по амплитуде среднее время затухания флуоресценции Cer согласно

приведённой цветовой шкале. Изображения получали и анализировали, используя FLIM систему Альба 5 с пакетом программного обеспечения VistaVision Suite (v. 204) (ISS, Champaign, IL), используя импульсное возбуждение флуоресценции.

б – FLIM-изображения клеток, экспрессирующих Ser конъюгированный с TIR доменом TLR5, в присутствии различных концентраций пептида Cy3-TR667.

в–д – FLIM-изображения клеток, экспрессирующих Ser не конъюгированный с TIR доменом и инкубированных без пептида (**в**) или в присутствии 40 мкМ пептида Cy3-TR667 (**г**) или Cy3-5R667 (**д**).

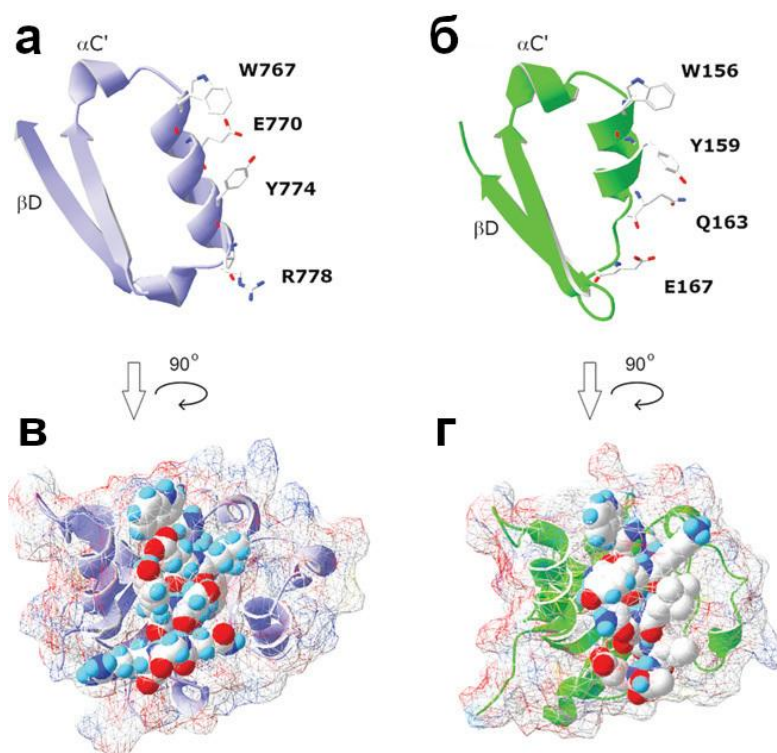


Рисунок 52 — Структурные регионы TIR доменов TLR5 и TIRAP, представленные пептидами 5R667 и TR667, соответствуют центральной спирали третьего спирального участка (Javmen et al., 2023)

а, б – укладка сегментов TIR домена TLR5 (**а**) и TIRAP (**б**), включающих в себя третий и четвёртый β -тяжи и соединяющий их спиральный участок. Боковые цепи показаны только для поверхностно расположенных, эволюционно сохранных аминокислотных

остатков, входящих в пептиды 5R667 и TR667 (Javmen et al., 2023; Toshchakov & Neuwald, 2020).

в, г – структурные модели TIR доменов TLR5 и TIRAP. Аминокислотные остатки, сегментов, соответствующих пептидам 5R667 и TR667, показаны в заполняющем пространство режиме с окраской атомов по Кори-Поулинг-Колтуну (CPK color mode). Трёхмерная модель TIR домена TLR5 была построена с помощью программного обеспечения RoseTTAFold на сервере Robetta (Baek et al. 2021). При создании рисунка использовалась модель TIR домена TIRAP, извлечённая из Банка белковых структур (PDBID: 5UZH) (Berman et al. 2002). Модели представлены с помощью программы Swiss PDB-Viewer (Guex and Peitsch 1997).

4.3.7 Модель взаимодействия TIR доменов при образовании цитоплазматического сигнального комплекса активированными TLR. Классификация ингибирующих пептидов на основании блокируемых сайтов функциональных TIR-TIR взаимодействий

Анализ совокупности накопленных данных по скринингу пептидных библиотек (всего нами было проскринировано 10 библиотек TIR доменов: 7 библиотек рецепторов и 3 библиотеки адаптерных TIR доменов (Табл. 1)), а также по связыванию идентифицированных ингибиторных пептидов с различными TIR доменами (Табл. 3), позволил предложить модель взаимодействия TIR доменов в иницирующем сигнальном комплексе и классифицировать ингибиторные пептиды согласно сайтам TIR-TIR связывания, отвечающим за формирование первичного сигнального комплекса, рекрутирование адаптеров и инициацию передачи сигнала. Полный список идентифицированных в скринингах ингибиторных пептидов и их классификация приведены в таблице 3. Следует отметить, что описанная ниже модель, а также классификация функциональных сайтов взаимодействия TIR доменов, в целом не противоречит, но уточняет модели, независимо предложенные другими исследователями на основании структуры олигомерных комплексов, спонтанно образуемых TIR

доменами адаптерных белков (Clabbers et al., 2021; Ve et al., 2017). Предложенные модели сходятся в том, что связывание лиганда с эктодоменами TLR на первом этапе ведёт к образованию комплекса, включающего две молекулы TLR. Отличительной чертой активирующего сигналинга комплекса является то, в таком комплексе С-концы эктодоменов TLR приведены и находятся в непосредственной близости друг от друга, что позволяет цитоплазматическим TIR доменам двух рецепторных цепей образовать димер (Kirk & Bazan, 2005). Димеризация TIR доменов рецепторов формирует композиционный сайт связывания, к которому рекрутируется TIR домен адаптерного белка согласно кооперативному механизму взаимодействия, предполагающему, что связываемый TIR адаптерного белка взаимодействует с обоими TIR доменами рецепторного димера ((Toshchakov et al., 2011), Рис. 1б, Рис. 53).

Рекрутирование первого адаптерного TIR домена стабилизирует рецепторный димер и создаёт добавочные композитные сайты связывания, к которым рекрутируются дополнительные молекулы адаптерных белков (Clabbers et al., 2021; Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020; Ve et al., 2017) (Рис. 53). Рекрутирование адаптерных TIR доменов ведет к образованию двуцепочечного линейного комплекса, в котором TIR домены отдельных цепей расположены параллельно, причем TIR домены рецепторов располагаются в одной из двух цепей комплекса (Clabbers et al., 2021; Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020; Ve et al., 2017) (Рис. 1и, Рис. 53). Модель формирования сигнального комплекса, предложенная нами на основании позиций сегментов последовательностей TIR доменов, проявляющих ингибиторные свойства, имеет некоторые отличия от модели, основывающейся на структурных исследованиях комплексов адаптерных TIR доменов. Основное отличие заключается в том, что наша модель предусматривает возможность двунаправленной элонгации начального комплекса ((Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020), Рис. 53), тогда как модели Ve et al. полагают, что элонгация начального рецепторного TLR

комплекса возможна только в одном направлении, в сторону свободной петли ВВ рецепторного димера ((Clabbers et al., 2021; Nimma et al. 2021; Ve et al., 2017).

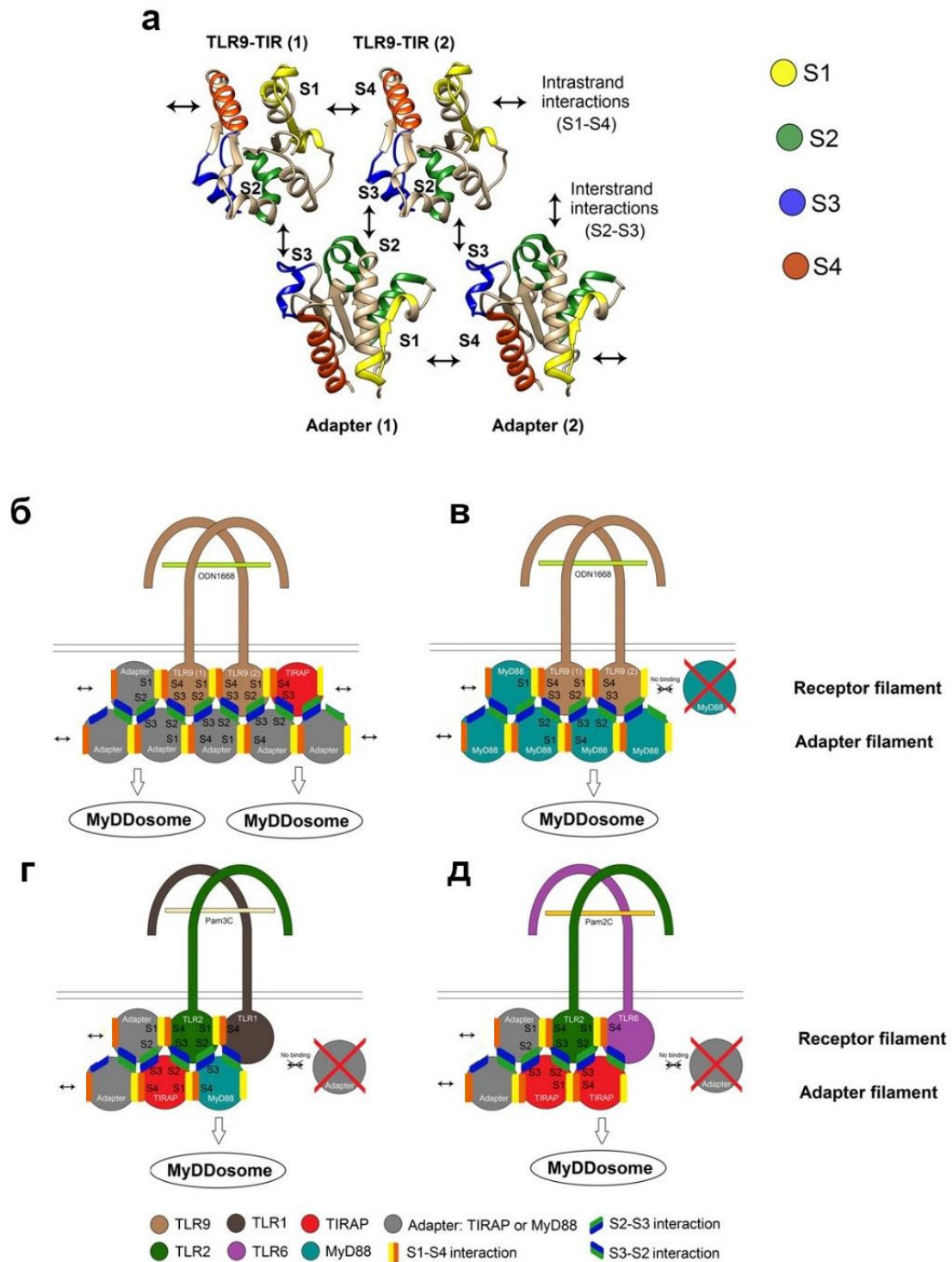


Рисунок 53 — Вероятные сайты и модель взаимодействия TIR доменов в иницирующем передаче сигнала комплексе при активации TLR (Javmen et al., 2018)

а – структурные модели TIR доменов, показывающие геометрию взаимодействия доменов при димеризации TIR доменов рецепторов и рекрутировании адаптерных белков. Сайты связывания обозначены на рисунке как S1 – S4. Сайты S1 и S4 расположены на противоположных концах TIR домена, в районах краевых тяжей β -листа, и взаимодействуют между собой, образуя внутрицепочечные связи. Сайты S2 и S3 располагаются в одной полусфере TIR домена и осуществляют связи между цепями двуцепочечного сигнального комплекса. Сайт S2 формируется спиралями В и/или С; сайт 3 — спиралью D вместе с прилегающими петлями (Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020).

б – схема взаимодействия TIR доменов в сигнальном комплексе при активации TLR9 в присутствии обоих адаптеров MyD88-зависимого пути, TIRAP и MyD88. Сайты S1 и S4 TIR доменов рецепторов и адаптеров, реципрокно взаимодействуя, образуют междоменные связи внутри каждой из цепей двуцепочечной структуры комплекса, тогда как сайты S2 и S3 формируют межцепочечные связи (Javmen et al., 2018). В присутствии TIRAP начальный комплекс может элонгироваться двунаправленно, причем элонгация в направлении S1 рецептора может осуществляться исключительно за счёт связывания TIRAP.

в – схема взаимодействия TIR доменов в сигнальном комплексе при активации TLR9 в отсутствие TIRAP. В этих условиях комплекс может элонгироваться только однонаправленно, за счет присоединения TIR домена MyD88 к S4 рецепторного димера

г, д – схемы взаимодействия TIR доменов в сигнальных комплексах при активации гетеродимеров TLR2 с TLR1 (**д**) или TLR6 (**е**), основывающиеся на данных о дифференциальном рекрутировании адаптерных белков TIR доменами TLR1 и TLR6 (Piao et al., 2016).

На основании анализа взаимного расположения сегментов, представляющих активные БП на поверхности TIR доменов, было предложено, что активные пептиды происходят из 4-х топологически сохранных сайтов TIR-TIR взаимодействий, ответственных за сборку сигнальных комплексов активированными TLR (Рис. 53) (Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020). Два сайта (сайты S1 и S4) расположены на противоположных сторонах TIR домена в районах краевых тяжей β -листа.

В дополнение к аминокислотным остаткам, формирующим β -тяж В, сайт S1 может быть представлен сегментами прилежащих петель АВ и/или ВВ, а также (в случае рецепторов TLR2, TLR4 и TLR7) сегментом, соединяющим TIR с трансмембранной спиралью (Javmen et al., 2020; Toshchakov et al., 2011; Toshchakov & Javmen, 2020). Сайт S4 представлен пептидами, соответствующими тяжу Е, а также прилегающей к тяжу Е α -спирали Е (Javmen et al., 2020, 2023; Toshchakov & Javmen, 2020) (Табл. 3). Сайты S2 и S3 образованы тремя спиральными участками, прилегающими к β -листу с его выпуклой стороны: спиралями В, С и D. Спираль В и/или С образуют сайт S2; спираль D — сайт S3 (Рис. 53) (Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020). Было предложено, что сборка первичного сигнального комплекса активированными TLR осуществляется за счёт асимметричных взаимодействий сайта S1 с сайтом S4, а также реципрокных взаимодействий сайта S2 с сайтом S3 (Clabbers et al., 2021; Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020; Ve et al., 2017) (Рис. 53).

В заключение раздела, исследующего связывание демонстрирующих ингибиторные свойства в функциональных тестах БП с TIR доменами, можно констатировать, что полученные данные убедительно подтверждают предполагаемый механизм действия, заключающийся в связывании пептидами TIR доменов белков, осуществляющих сборку первичного сигнального комплекса. Важно отметить достаточно точное совпадение концентрационной зависимости эффектов БП по ингибированию передачи сигнала TLR с концентрационной зависимостью связывания БП с TIR доменами в экспериментах на клетках. В обоих случаях выраженный эффект наблюдается при применении пептидов в достаточно узком диапазоне микромолярных концентраций (5–40 мкМ). Также, важным представляется наблюдение о том, что константы связывания БП с рекомбинантными TIR доменами, измеренные в бесклеточной *in vitro* системе, более чем на порядок ниже кажущихся констант связывания при внеклеточном применении БП в клеточной системе. Этот факт,

экспериментально продемонстрированный для пептид-TIR пары 2R9-TIRAP, показывает, что перенос пептидов через плазматическую мембрану существенно лимитирует ингибиторную активность пептидов, а также указывает на то, что оптимизация трансмембранного вектора является перспективным способом повышения эффективности БП.

4.4 Оценка эффективности системного ингибирования функции TLR блокирующими пептидами в экспериментах на мышах

Способность агентов модулировать ту или иную биологическую функцию *in vivo*, не оказывая при этом существенного влияния на другие жизненно важные функции организма, является убедительным доказательством специфичности действия агента и демонстрирует перспективность его дальнейшей разработки для применения в медицине или ветеринарии. В связи с этим, БП, демонстрирующие наиболее высокую активность в экспериментах на культивируемых клетках, были протестированы в экспериментах на мышах. Ингибиторная активность пептидов оценивалась в экспериментах трёх типов. Эксперименты первого типа тестировали способность пептидов ингибировать системную продукцию цитокинов, индуцированную введением животному нелетальной дозы агониста того или иного TLR. Пептиды, показывающие высокую активность в тестах первого уровня, тестировались в более жёстких экспериментах на способность предотвращать гибель, индуцированную введением большой дозы LPS или агониста TLR9 в сочетании с D-галактозамином (D-gal). Третий тип экспериментов оценивал способность БП модулировать реакцию организма на патоген. Оценивалась способность пептидов снижать системную продукцию цитокинов и смертность при инфицировании мышей вирусом гриппа.

4.4.1 Оценка влияния БП пептидных библиотек TIR доменов адаптерных белков на системную индукцию цитокинов, вызванную введением нелетальной дозы LPS

Первыми TIR пептидами, ингибиторная активность которых была протестирована *in vivo*, были 2 пептида библиотеки адаптера TIRAP: пептиды TR5 и TR6 (Couture et al., 2012). В этих опытах пептиды вводились мышам линии C57BL/6J интраперитонеально в дозе 10 нмоль/г веса животного за 1 час до стимуляции продукции цитокинов введением LPS. LPS вводился в дозе 1 мкг/г также интраперитонеально. Забор проб крови осуществлялся через 1, 2 и 4 часа после введения LPS. Введение обоих ингибирующих пептидов, но не инертного пептида TR7, вызывало значительное снижение содержания циркулирующих цитокинов на протяжении всего периода наблюдения (Рис. 54а). Снижение было наиболее выражено на временных точках максимального повышения содержания цитокинов в сыворотке. Так, содержание TNF через час после стимуляции и содержание IL-6 через 2 часа после индукции в пробах мышей, получивших ингибиторные пептиды, было менее 10% от их содержания в пробах крови мышей, не обработанных пептидом или обработанных пептидом, не проявляющим ингибиторную активность (Рис. 54а). Вместе с тем, можно отметить некоторое повышение содержания IL-6 в сыворотке получивших БП мышей к четвёртому часу после стимуляции (Рис. 54а). Однако, несмотря на такое повышение, содержание IL-6 в сыворотках оставалось достоверно сниженными в сравнении с контрольными мышами (Рис. 54а).

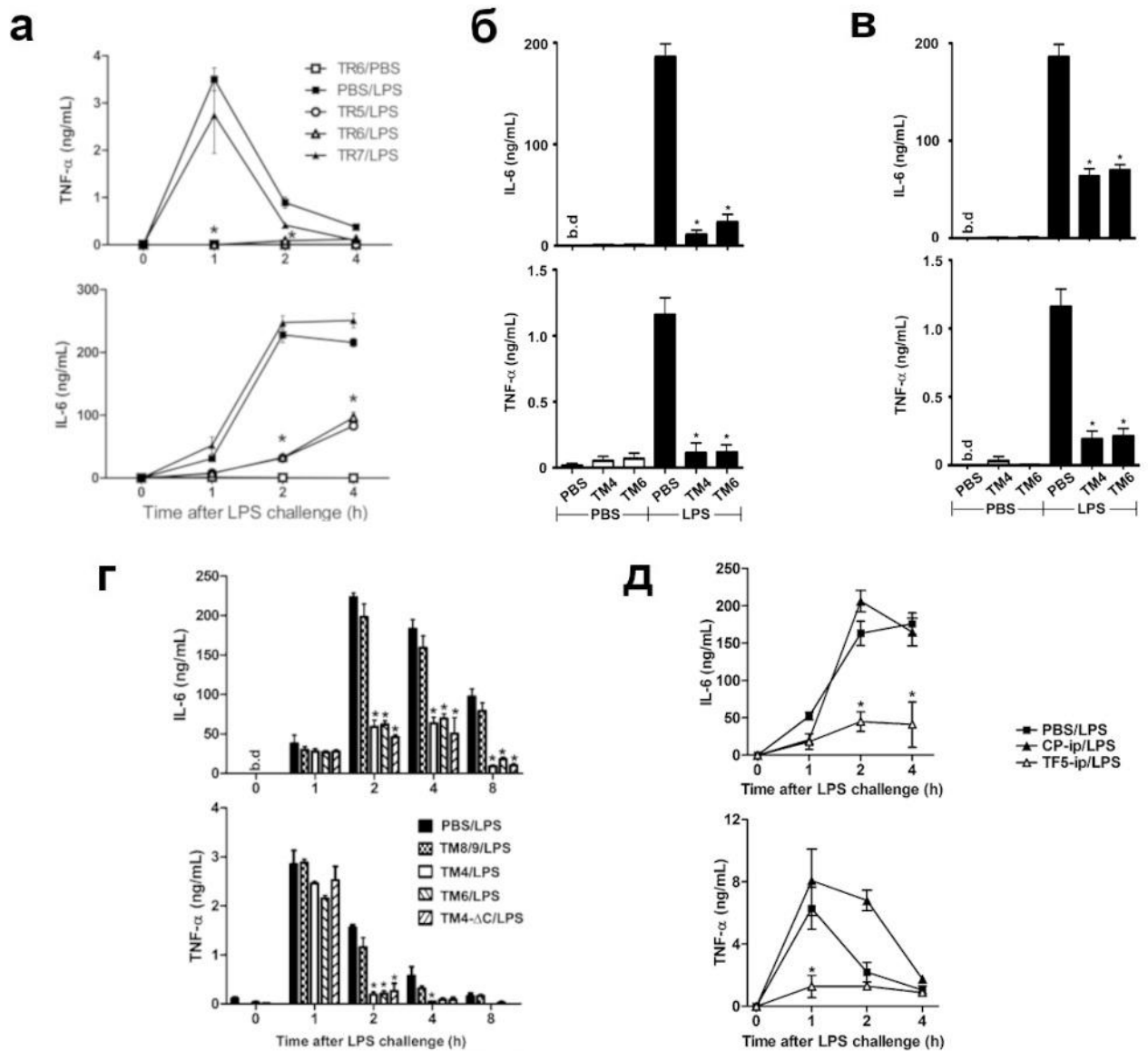


Рисунок 54 — Влияние ингибирующих пептидов на системную индукцию цитокинов у мышей линии C57BL/6J при введении LPS (Couture et al., 2012; Piao, Ru, et al., 2013a; Piao, Vogel, et al., 2013b)

Пептиды вводились за час (**а**, **б** и **д**) до или 30 мин после (**в**, **г**) введения высокоочищенного LPS *E. coli*. Пептиды и LPS вводились интраперитонеально в дозах 10 нмоль/г и 1 мкг/г веса животного, соответственно.

а – динамика содержания IL-6 и TNF в сыворотках крови мышей, получивших контрольные инъекции PBS или инъекции пептидов TR5 и TR6 (библиотека адаптера TIRAP).

б – влияние пептидов TM4 и TM6 (библиотека TIR домена адаптера TRAM) на циркулирующие IL-6 и TNF в сыворотках крови мышей через 2 часа после стимуляции LPS. Пептиды вводились за 1 час до введения LPS.

в – влияние пептидов TM4 и TM6 на циркулирующие IL-6 и TNF в сыворотках крови мышей через 2 часа после стимуляции LPS. Пептиды вводились через 30 минут после введения LPS.

г – динамика содержания IL-6 и TNF в сыворотках крови мышей при введении пептидов через 30 минут после LPS.

д – динамика содержания IL-6 и TNF в сыворотках крови мышей, получивших контрольные инъекции или инъекции пептида TF5 (библиотека адаптера TRIF).

В последующей работе тестировались ингибиторные пептиды библиотеки адаптера TRAM: пептиды TM4, TM6, а также версия пептида TM4, содержащая делецию С-конца, пептид TM4-ΔC. В этой серии экспериментов сравнивалась эффективность ингибирования продукции цитокинов при так называемом «профилактическом» введении пептидов (пептиды вводились за 1 час до введения LPS) с эффективностью ингибирования при «терапевтическом введении» (пептиды вводились через 30 минут после интраперитонеального введения LPS). Пептиды TM4 и TM6 вызывали значительное снижение содержания циркулирующих TNF и IL-6 через 2 часа после стимуляции LPS при профилактическом введении пептидов, аналогично снижению, наблюдаемому при введении пептидов TR5 и TR6 (Рис. 54б). При введении пептидов после введения LPS ингибирующий эффект наблюдался уже в пробах крови, взятых через 2 часа после введения LPS (через 1,5 часа после введения пептидов), но эффект при терапевтическом введении был ожидаемо несколько ниже такового при профилактическом введении (Рис. 54в). Более детальное изучение динамики содержания цитокинов при терапевтическом введении показало, что ингибирующий эффект сохранялся длительное время после введения БП, но ингибирование развивалось с некоторой задержкой (Рис.

54г). Так, ингибирования не наблюдалось в первой временной точке (1 час после введения LPS и 30 минут после введения пептидов (Рис. 54г).

Тестирование пептида TF5 (этот пептид представляет библиотеку TIR пептидов адаптера TRIF (Рис. 37)) показало, что этот БП также демонстрирует выраженную ингибиторную активность, аналогичную активности пептидов других адаптерных библиотек (Рис. 54д).

Дозозависимость влияния ингибиторных пептидов на LPS-индуцированную продукцию цитокинов *in vivo* была изучена на примере пептидов библиотеки адаптера TRAM (Piao, Vogel, et al., 2013b). Пептиды вводились интраперитонеально в дозах 2,5, 10 и 25 нмоль/г веса животного за 1 час до введения LPS. В качестве контрольного пептида в данных экспериментах использовался пептид, содержащий блокирующую последовательность пептида TM6, но не включающий вектор *Antp*, присутствующий в других пептидах для обеспечения проникновения конструкции в клетку (TM6-wo *Antp*). Применение пептидов TM4 и TM6 в дозе 2,5 нмоль/г в целом оказывало меньший эффект на циркулирующие цитокины, чем доза 10 нмоль/г (Рис.55 б–г), тогда как повышение дозы пептидов до 25 нмоль/г не вызывало заметного снижения при сравнении с дозой 10 нмоль/г (Рис.55 б, г). БП, лишённый вектора, обеспечивающего внутриклеточное проникновение пептидов, ожидаемо не вызывал достоверных изменений в концентрации циркулирующих цитокинов в сравнении с животными, получившими PBS (Рис.55 б, г). На основании полученных данных была выбрана доза 10 нмоль/г для использования в дальнейших экспериментах.

В отдельной серии экспериментов было проведено систематическое сравнение ингибирующей активности БП при их интраперитонеальном и внутривенном введении. Были протестированы пептиды TM4, TM6, TM4-ΔC и TF5. Оценивалась динамика содержания TNF и IL-6 в крови мышей после однократного введения животным LPS в дозе 1 мкг. Пептиды вводили в дозе 10 нмоль/г за час до введения LPS. Как

интраперитонеальное, так и внутривенное введение БП вызывало достоверное снижение циркулирующих цитокинов (Рис. 56). Вместе с тем, для всех условий эксперимента можно отметить несколько меньший ингибиторный эффект при введении пептидов внутривенно (Рис. 56).

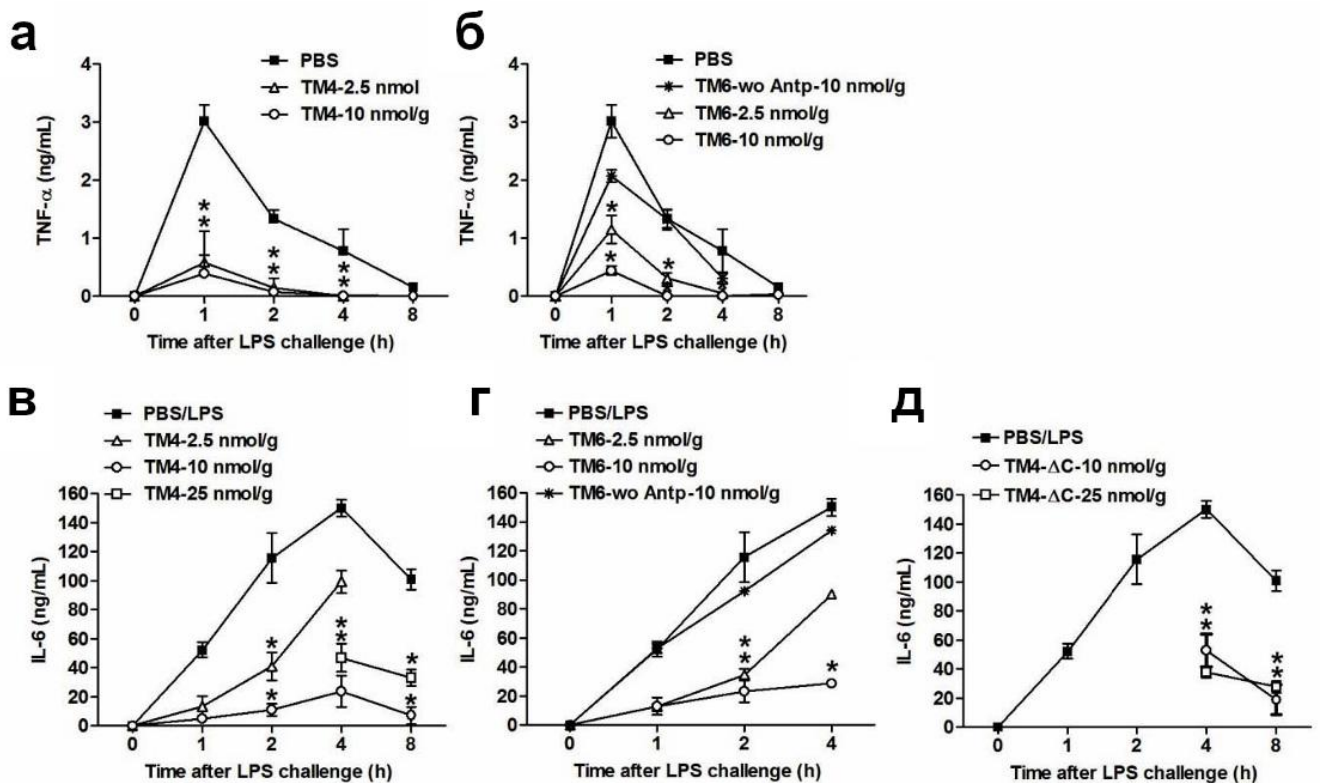


Рисунок 55 — Дозозависимость влияния ингибирующих пептидов на концентрацию циркулирующих TNF (а, б) и IL-6 (в–д) в крови мышей линии C57BL/6J после введения LPS (Piao, Vogel, et al., 2013b)

Пептиды вводились за час до введения высокоочищенного LPS *E. coli*. LPS вводился интраперитонеально в дозе 1 мкг/г веса животного.

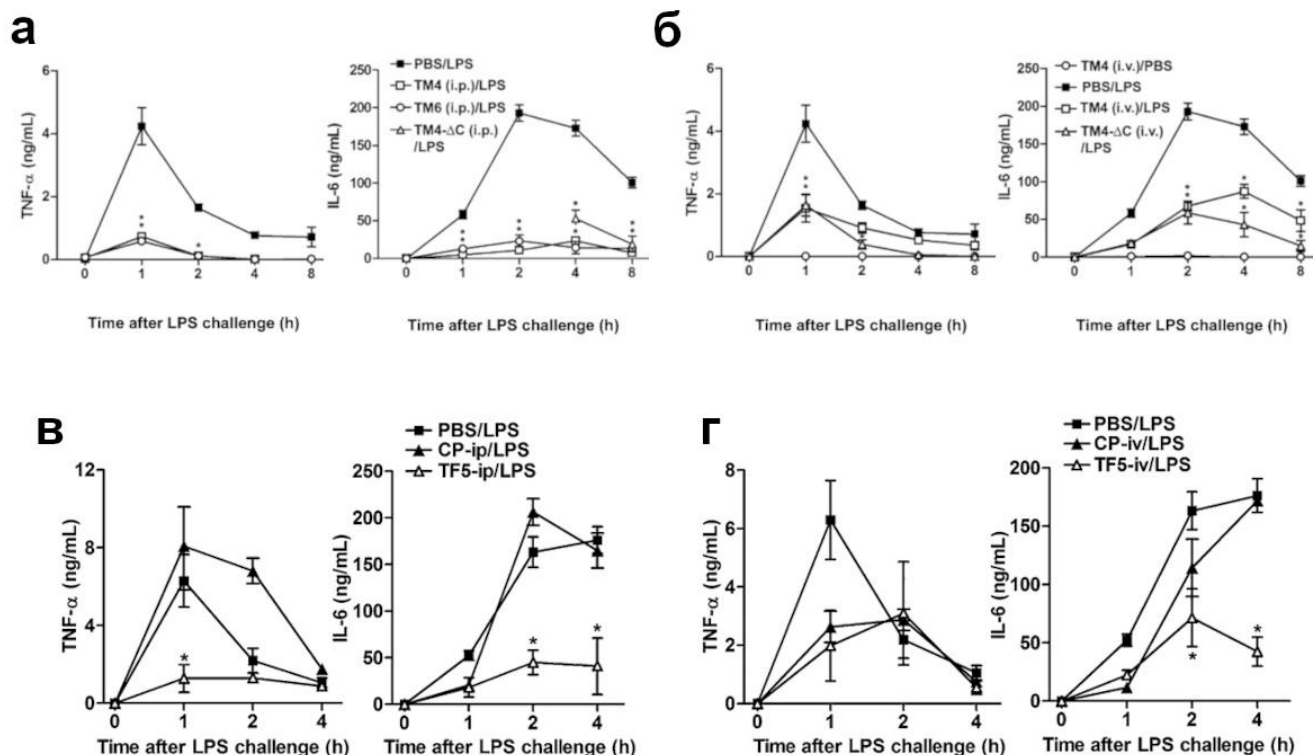


Рисунок 56 — Влияние способа введения БП на эффективность ингибирования TLR (Piao, Ru, et al., 2013a; Piao, Vogel, et al., 2013b)

Пептиды в дозе 10 нмоль/г вводились интраперитонеально (ip) (а, в) или внутривенно (iv) (б, г) за час до введения высокоочищенного LPS *E. coli* (1 мкг/г, ip).

Тестирование адаптерных пептидов в экспериментах на мышах убедительно продемонстрировало, что пептидные ингибиторы TLR способны блокировать системный ответ на введение LPS. Такая способность была продемонстрирована для пептидов TR5, TR6, TM4, TM6, TM4-ΔC и TF5 (Couture et al., 2012; Piao, Ru, et al., 2013a; Piao, Vogel, et al., 2013b).

4.4.2 Оценка системной эффективности БП пептидных библиотек TIR доменов TLR

4.4.2.1 Пептид 2R9 — мультиспецифический ингибитор TLR *in vivo*

Скрининг пептидной библиотеки TIR домена TLR2 идентифицировал пептид 2R9 как мультиспецифический ингибитор TLR, который, помимо TLR2, ингибировал TLR4, TLR7 и TLR9 (Рис. 15–17, (Piao et al., 2015)). С целью оценки способности пептида 2R9 ингибировать TLR *in vivo* в первой серии экспериментов была изучена динамика и дозозависимость системного цитокинового ответа мышей на однократное интраперитонеальное введение P3C (агонист, активирующий гетеродимер TLR1/TLR2) и резихимода (R848, агонист TLR7). P3C в дозе 3,3 нмоль/г индуцировал значимый системный цитокиновый ответ, который длился более 4-х часов после введения агониста (Рис. 57а, б). R848 в дозе 2,5 нмоль/г вызывал мощную продукцию IL-12p40, максимальная концентрация которого наблюдалась в крови через 3 часа после введения R848 (Рис. 57с). R848 также вызывал быстрое и транзитное повышение продукции IFN- α , пик которой наблюдался через 1 час после стимуляции (Рис. 57д). Увеличение дозы R848 до 5 нмоль/г парадоксальным образом вызывало несколько меньший ответ (Рис. 57в, г), что, однако, подтвердило ранее опубликованные данные о том, что доза R848 2,5 нмоль/г вызывает оптимальный ответ в мышах (Hemmi et al., 2002). На основании полученных данных в дальнейших экспериментах на мышах использовались дозы P3C и R848 3,3 и 2,5 нмоль/г, соответственно.

Тестирование пептида 2R9 на способность ингибировать системную продукцию цитокинов, индуцированную однократным введением мышам P3C или R848, показало высокую эффективность этого пептида *in vivo*. Эффект 2R9 сравнивался с эффектом контрольного пептида, не способного блокировать TLR, пептида 2R8 (Рис. 15), а также с эффектом пептида TR6, ингибиторная активность которого в отношении TLR2 была показана нами ранее (Рис. 31) (Couture et al., 2012). Пептиды вводились мышам *ip* в дозе 10 нмоль/г за 1 час до стимуляции TLR. Измерялась динамика содержания

TNF, IL-12p40 и IL-6 в крови мышей в течение первых часов после стимуляции TLR (Рис. 58).

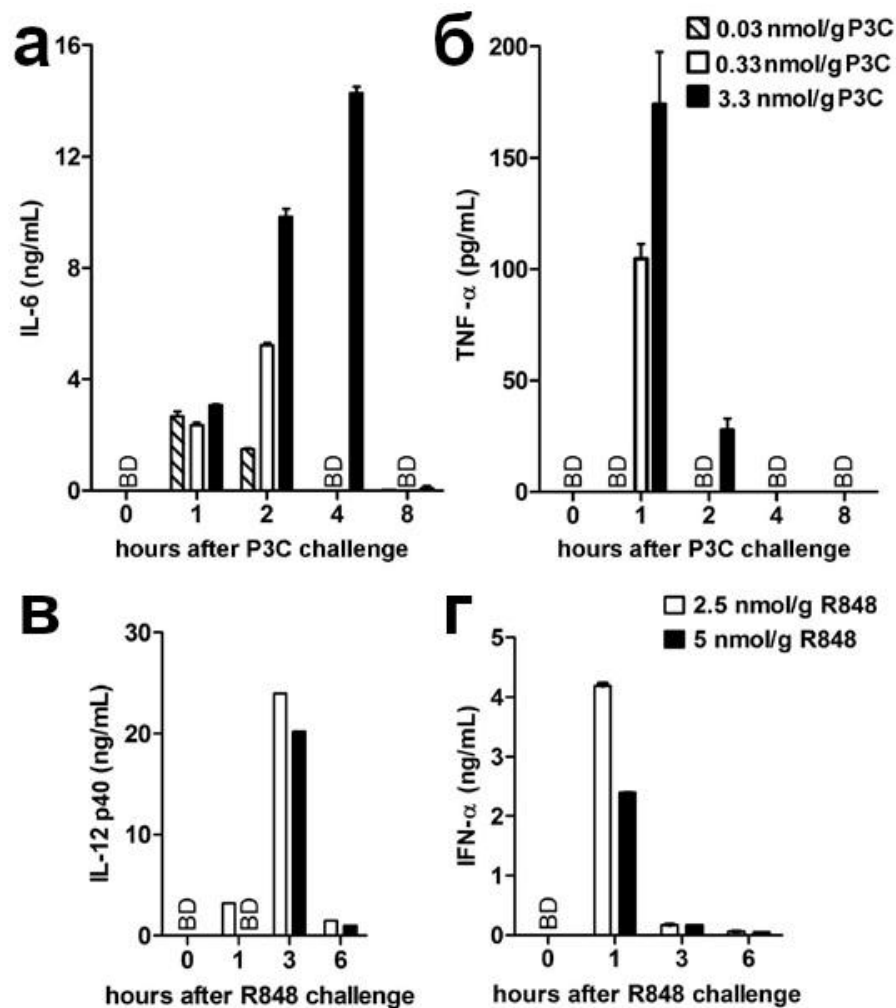


Рисунок 57 — Динамика и дозозависимость системного цитокинового ответа на введение агониста TLR2 (а, б) и TLR7 (в, г) (Piao et al., 2015)

Агонисты TLR вводились мышам линии C57BL/6J ip в указанных дозах.

Пептид 2R9 практически полностью предотвращал ранний всплеск продукции TNF, индуцированный введением P3C, содержание TNF в пробах крови мышей, предобработанных пептидом 2R9, оставалось на уровне порога детекции на протяжении всего периода наблюдения (Рис.

58а). Пептид TR6 также снижал P3C-стимулированную продукцию TNF, однако эффект был существенно слабее. TR6 снижал циркулирующий TNF на ~50% от пиковых значений (Рис. 58а). Уровни IL-12p40 тоже достоверно снижались обоими ингибирующими пептидами, причём 2R9 оказывал более выраженный эффект (Рис. 58б), тогда как инертный пептид 2R8 достоверно не влиял на содержание цитокинов в сыворотках (Рис. 58). Вместе с тем БП не оказывали достоверного влияния на содержание IL-6 в первые 2 часа после стимуляции, что объяснялось высокой вариабельностью этого параметра в первые часы после индукции (Рис. 58в). Оба ингибирующих пептида, однако, заметно сокращали время персистенции IL-6 в циркуляции. 2R9 статистически достоверно снижал IL-6 уже к четвертому часу после стимуляции, а TR6 к шестому (Рис. 58в).

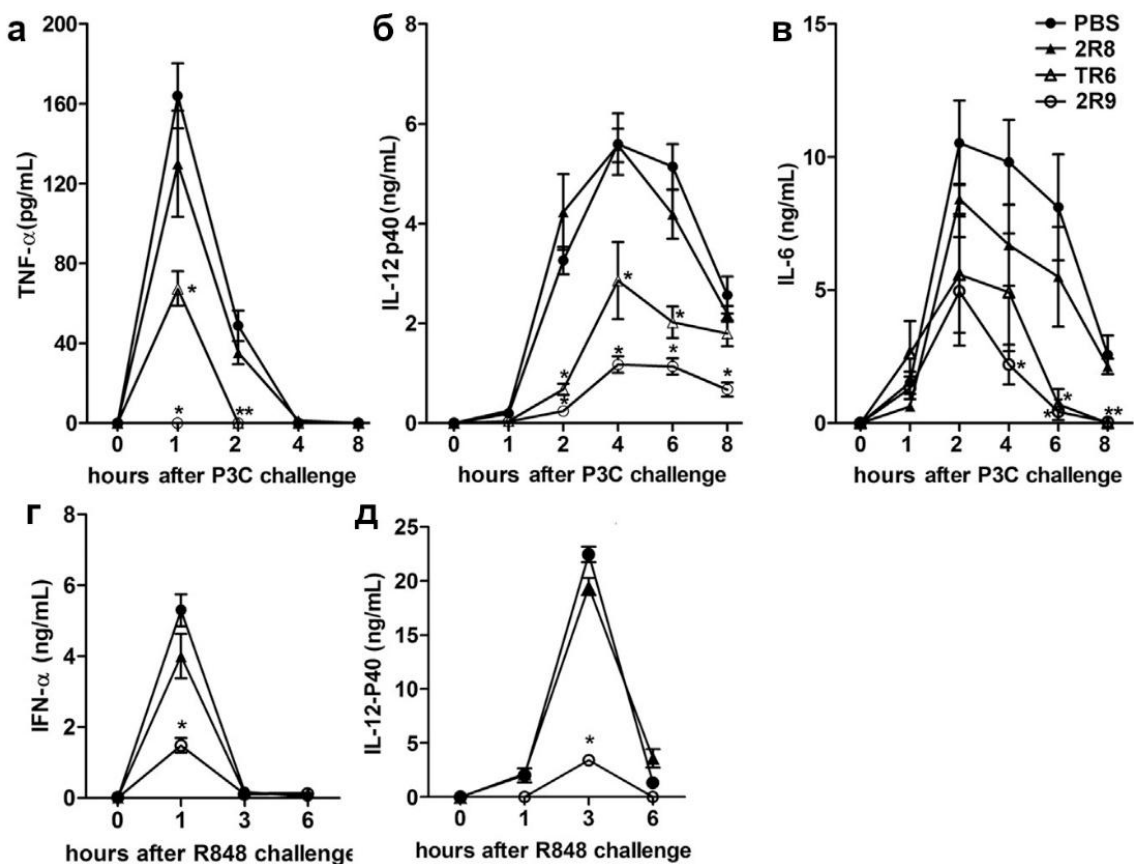


Рисунок 58 — Влияние пептида 2R9 на динамику циркулирующих цитокинов, индуцированных активацией TLR2 (а–в) или TLR7 (г, д) (Piao et al., 2015)

Агонисты TLR2 и TLR7 вводились мышам линии C57BL/6J интраперитонеально в дозах 3,3 и 2,5 нмоль/г, соответственно.

Пептид 2R9, но не контрольный пептид 2R8, достоверно снижал системные уровни IFN- α и IL-12p40, индуцированные введением резихимода мышам (Рис. 58г, д). Полученные данные, таким образом, убедительно показали возможность системного ингибирования TLR2 и TLR7 *in vivo* пептидными ингибиторами.

4.4.2.2 Пептид 9R34- Δ N — специфический ингибитор TLR9 *in vivo*

Скрининг пептидной библиотеки TIR домена TLR9 идентифицировал пептид 9R34 как специфический ингибитор TLR9 (Рис. 20, 21), который оказывает ингибиторное действие за счёт связывания TIR домена TLR9 и, с меньшей аффинностью, TIRAP (Рис. 48). Версия пептида 9R34, содержащая укороченную с N-конца блокирующую часть, пептид 9R34- Δ N, был сравним с прототипом по эффективности ингибирования (Рис. 22), но демонстрировала лучшую растворимость в солевых растворах и сыворотке крови (Javmen et al., 2018), в связи с чем в экспериментах *in vivo* использовался пептид 9R34- Δ N. Анализировалась динамика содержания цитокинов TNF и IL-12p40 после однократного интраперитонеального введения специфического агониста TLR9, олигонуклеотида 1668 (ODN1668) (Рис. 59а, б). В качестве контроля использовался описанный выше мультиспецифический ингибитор TLR, пептид 2R9. С целью подтверждения полученных на культуре клеток данных о различной специфичности ингибирования TLR пептидами 9R34- Δ N и 2R9 (пептид 9R34- Δ N ингибировал TLR9, но не другие протестированные TLR, тогда как 2R9 ингибировал TLR2, TLR4, TLR7 и TLR9), пептиды 9R34- Δ N и 2R9 также

были протестированы и на способность ингибировать TLR2 *in vivo* (Рис. 59в, г).

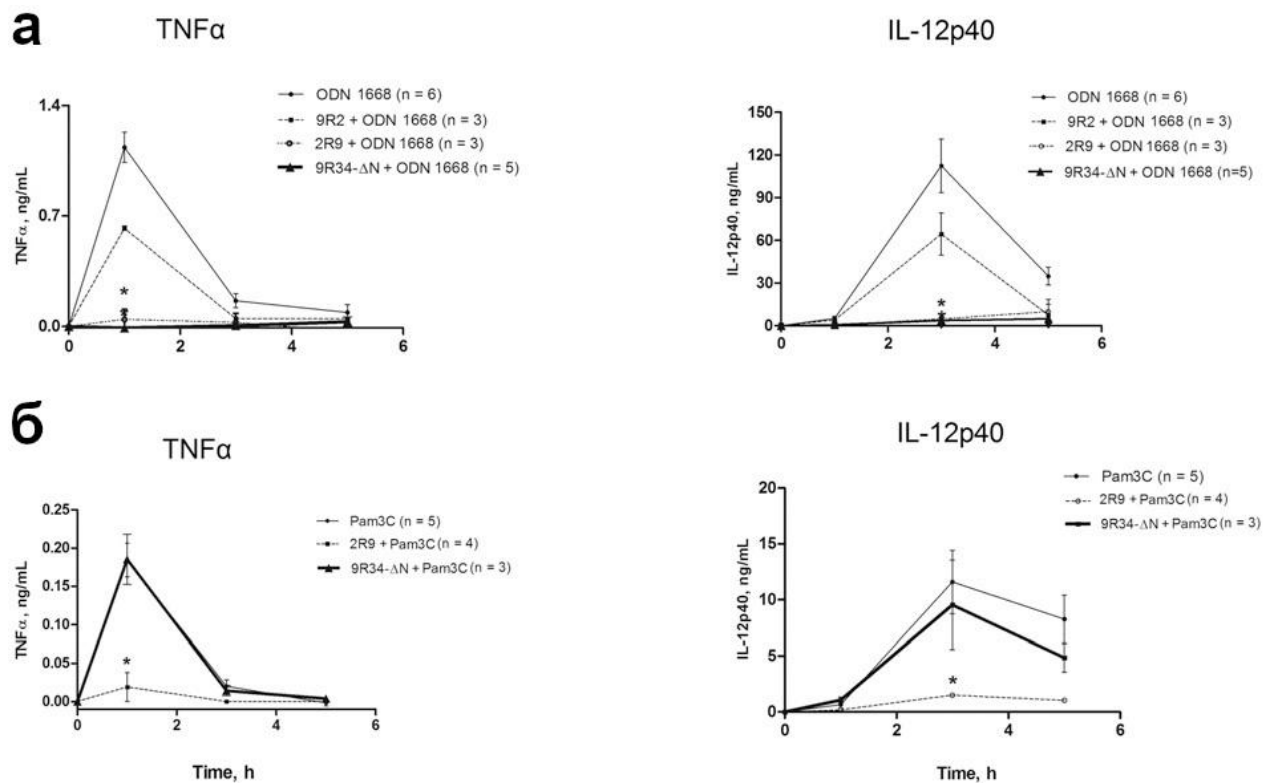


Рисунок 59 — Влияние пептидов 9R34-ΔN и 2R9 на динамику циркулирующих TNF и IL-12p40, индуцированных агонистом TLR9 ODN1668 (а) или Pam3C, агонистом TLR2 (б) (Javmen et al., 2018)

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

Оба тестируемых пептида оказывали мощное ингибиторное действие на продукцию цитокинов, стимулированную введением ODN1668. Как 9R34-ΔN, так и 2R9 снижали содержание TNF и IL-12p40 более чем на 90% от их пиковых значений (Рис. 59а), причём эффект пептида 9R34-ΔN был несколько более выражен. Эффективность пептидов, однако, резко

различалась в отношении продукции цитокинов, индуцированной агонистом TLR2, триацилированным липопептидом Pam3C, – мультиспецифический ингибитор TLR, пептид 2R9, блокировал TLR2, тогда как пептид 9R34-ΔN не влиял на цитокиновый профиль после введения Pam3C (Рис. 59б). Данные, полученные *in vivo* в экспериментах на мышах (Рис. 59), таким образом, полностью подтвердили данные экспериментов с культивируемыми клетками о резком различии специфичности пептидов 9R34-ΔN и 2R9 – 2R9 блокирует серию TLR, тогда как 9R34-ΔN специфичен к TLR9.

4.4.2.3 Пептид 7R11 ингибирует TLR7 *in vivo*

Еще одним ингибитором, оказывающим мультиспецифическое действие на TLR, оказался пептид 7R11 (Рис. 23, 24). Пептид 7R11 оказывал ингибиторное действие за счёт связывания с TIR доменами адаптеров MyD88-зависимого сигнального пути, MyD88 и TIRAP (Рис. 49). Пептид 7R11, но не контрольный пептид 7R2, статистически достоверно снижал концентрации цитокинов в сыворотках мышей, получивших инъекцию резихимода (Рис. 60).

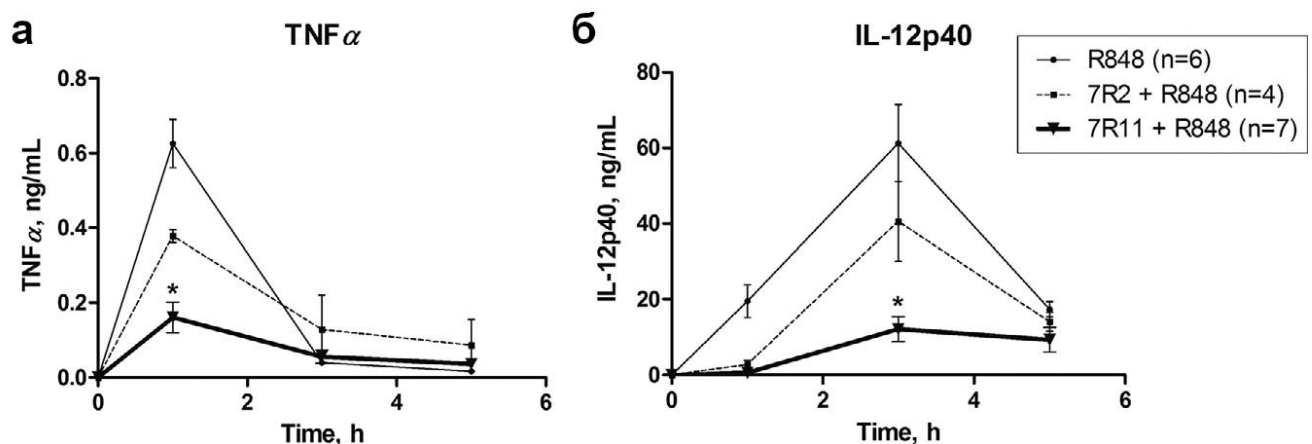


Рисунок 60 — Влияние пептида 7R11 на динамику циркулирующих TNF (а) и IL-12p40 (б), индуцированных активацией TLR7 (Javmen et al., 2020)

Резихимод (R848) (агонист TLR7) вводился мышам линии C57BL/6J *ip* в дозе 45 нмоль спустя час после введения пептидов в дозе 200 нмоль.

4.4.2.4 Пептид 5R667 ингибирует LPS-индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов *in vivo*

Эксперименты с использованием культивируемых клеток показали, что пептид 5R667 является мультиспецифическим ингибитором TLR (Рис. 27). 5R667, а также пептид TR667, происходящий из структурно-гомологичного региона TIRAP, ингибировали TLR2, TLR4, TLR5 и TLR9. С целью оценить эффективность этих ингибиторов *in vivo*, пептиды 5R667 и TR667 были протестированы на способность ингибировать LPS-индуцированную продукцию цитокинов в мышах. Отметим, что в этих экспериментах LPS вводился мышам в дозе 10 мкг/г, что на порядок превышает дозу, использовавшуюся в экспериментах, представленных выше на рисунках 54–56. Такое увеличение дозы LPS вызывало более чем трёхкратное увеличение пиковой концентрации TNF и двукратное увеличение пиковых концентраций IL-6 в сыворотках (Рис. 61). Более того, резко изменялась динамика содержания TNF в крови — LPS-индуцированный подъём TNF переставал быть транзиторным, что проявлялось в отсутствии резкого падения содержания TNF ко второму и четвёртому часу, наблюдавшегося после *ip* введения LPS в дозе 1 мкг/г (Рис. 54–56).

Несмотря на существенно более сильную индукцию TNF при введении LPS в дозе 10 мкг/г, пептиды 5R667 и TR667 снижали пиковую концентрацию TNF более чем на 50% (Рис. 61а). Вместе с тем, содержание TNF в сыворотках оставалось повышенным в присутствии пептидов на протяжении всего периода наблюдения, что выражалось в отсутствии статистически значимого снижения TNF в присутствии пептидов 5R667 и TR667 на поздних сроках наблюдения, т.е., через 3 и 5 часов после

введения LPS (Рис. 61а). Кинетика активации IL-12p40 резко отличалась от таковой TNF — не наблюдалось значимого повышения содержания IL-12p40 в сыворотках на первый час после индукции, и IL-12p40 был резко повышен через 3 часа после стимуляции и оставался повышенным на пятом часу (Рис. 61б). Предварительное введение мышам как пептида 5R667, так и, в меньшей степени, TR667, вызывало статистически достоверное снижение содержания IL-12p40 в циркуляции (Рис. 61б). Кинетика индукции IL-6 напоминала кинетику активации IL-12p40. На первый час после введения LPS индукция была незначительной, но возрастала многократно к третьему и пятому часу (Рис. 61в). Отметим, однако, что несмотря на схожесть кинетик индукции IL-6 и IL-12p40, чувствительность этих цитокинов к ингибированию пептидами резко различалась — пептиды 5R667 и TR667 не снижали циркулирующий IL-6, в отличие от IL-12p40 (Рис. 61б, в). Такие различия в эффектах пептидов на активацию отдельных цитокинов объясняются различиями в устройстве промоторов этих генов. Замедленная индукция IL-6 и IL-12p40 в ответ на LPS указывает на более сложный механизм активации этих генов, требующий для полной активации дополнительных эндогенно-продуцируемых факторов, для активации которых требуется меньший набор модуляторов транскрипции (таких как, например, цитокины первой волны TNF или IFN- β). Зависимость экспрессии IL-6 и IL-12p40 от индукции дополнительных, эндогенно продуцируемых факторов объясняет как замедленную кинетику их индукции, так и различия в чувствительности к ингибиторам.

В этой серии экспериментов также тестировался пептид 4BB. Пептид 4BB был идентифицирован нами как мощный ингибитор TLR4 в ранних экспериментах с блокирующими пептидами (Toshchakov et al., 2011), однако этот пептид не применялся на животных в оригинальном исследовании. Более поздние исследования показали, что пептид 4BB ингибировал LPS-индуцированную продукцию цитокинов несколько более эффективно, чем пептиды 5R667 и TR667 (Рис. 61).

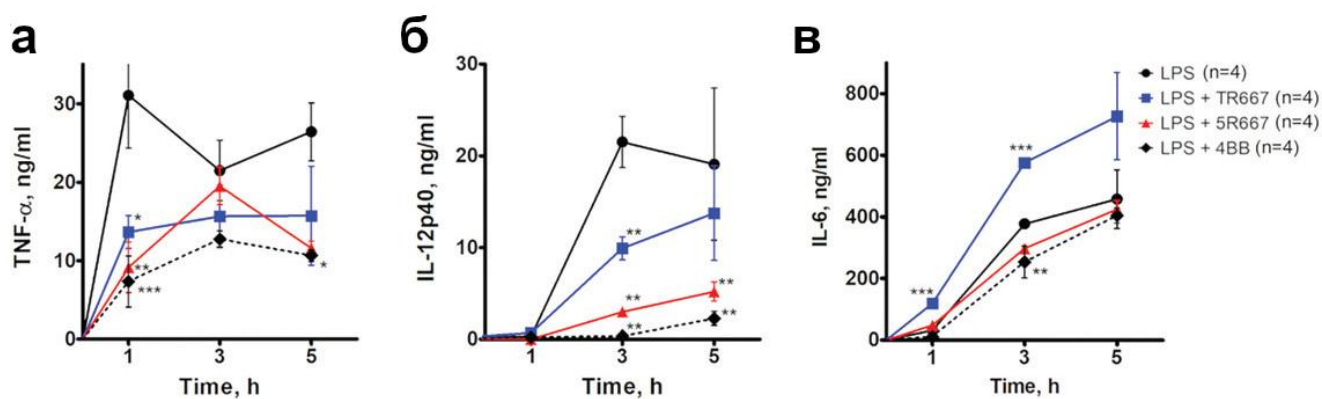


Рисунок 61 — Влияние пептида 5R667 на динамику циркулирующих TNF (а), IL-12p40 (б) и IL-6 (в), индуцированных введением LPS (Javmen et al., 2023)

LPS вводился мышам линии C57BL/6J ip в дозе 10 мкг/г через час после ip введения пептидов (10 нмоль/г).

Тестирование БП, происходящих из TIR доменов рецепторов, подтвердило их эффективность в модели *in vivo*. В экспериментах на мышах была подтверждена мультиспецифичность пептида 2R9, для которого было получено прямое подтверждение способности ингибировать TLR2, TLR7 и TLR9 (Рис. 58, 59) за счёт связывания адаптерных белков, общих для этих рецепторов (Рис. 51). Вместе с тем, был идентифицирован и пептид, блокирующий рецептор-прототип *in vivo*, но не другие члены семейства TLR. Примером пептида, демонстрирующего специфическое ингибирование TLR9, является пептид 9R34-ΔN (Рис. 59).

4.4.3 Оценка способности БП предотвращать TLR-индуцированную смертность

Системная активация TLR4 вызывает резкий рост содержания цитокинов в циркуляции, что в случаях чрезмерной активации может вызвать эндотоксический шок и смерть за счёт гепато- и вазо-токсичного

действия провоспалительных цитокинов. Мы использовали мышиную модель эндотоксического шока с целью оценки способности БП предотвращать LPS-индуцированную гибель. В первой серии экспериментов были протестированы адаптерные пептиды TM4, TM4-ΔC, TM6 и TR6. Мышам линии C57BL/6J вводился LPS *ip* в дозе 17,5 мкг/г, что вызывало 100% смертность в контрольной группе (Рис. 62а). Введение мышам пептидов-ингибиторов TLR4 оказывало выраженное защитное действие. Введение пептида TM4 или TM4-ΔC в дозе 10 нмоль/г за 1 час до введения LPS предотвращало смертность животных в 100% случаев (Рис. 62а).

Пептид TM6 также существенно улучшал выживаемость мышей, однако 3 из 13 мышей этой группы погибли (Рис. 62а). Пептид TR6, происходящий из структурно-гомологичного участка адаптера TIRAP, аминокислотная последовательность которого на 50% совпадает с последовательностью TM6 (Табл.1) (Piao, Vogel, et al., 2013b), защищал мышей от эндотоксического шока в сходной с TM6 степени (Рис. 62а). В группе мышей, получивших контрольный пептид TM8/9, выжила только одна мышь из семи, что достоверно ниже выживаемости в группах мышей, получивших любой из протестированных пептидов-ингибиторов TLR4 ($p < 0,0012$ для любой пары) (Piao, Vogel, et al., 2013b). Протестированный в отдельной серии экспериментов пептид TF5 также достоверно улучшал выживаемость мышей, получивших летальную дозу LPS (Рис. 62в) (Piao, Ru, et al., 2013a).

За исключением LPS, введение мышам агонистов других TLR не вызывает смерть животных. Животные, однако, могут быть сенсibilизированы к введению агонистов TLR, включая малые дозы LPS, а также TNF, путём введения D-галактозамина (D-gal). Модель сочетанного введения D-gal и агониста TLR9 олигонуклеотида ODN1668 использовалась для *in vivo* оценки ингибиторных свойств пептида 9R34 и его производного, пептида 9R34-ΔN (Javmen et al., 2018). D-gal вводился мышам *ip* в дозе 20

мг за 30 минут до введения пептидов в дозе 200 нмоль или контрольной инъекции PBS. ODN1668 вводился мышам *ip* в дозе 3,93 или 7,86 нмоль/мышь через час после введения пептидов. Обе использовавшиеся дозы ODN1668 вызывали 100% гибель в течение 20 часов в контрольной группе мышей (Рис. 62в, г). Введение пептидов 9R34 или 9R34-ΔN мышам, получившим 3,93 нмоль ODN1668, предотвращала смертность в 100% случаев (Рис. 62в). Введение пептидов, однако, было менее эффективно при двукратном увеличении дозы ODN1668, тем не менее более 50% мышей, получивших ODN1669 в летальной дозе 7,86 нмоль, выживали после предобработки пептидом 9R34-ΔN (Рис. 62г).

При оценке влияния пептидов на ODN1668-индуцированную гибель также использовался пептид TM4. Этот пептид, включающий в себя петлю BB TIR домена адаптерного белка TRAM, оказывал выраженное ингибиторное действие на передачу сигнала активированным TLR4, но не на TLR2 (Рис. 33–35) (Piao, Vogel, et al., 2013b). Как показано выше, профилактическое введение этого пептида защищало мышей, получивших летальную дозу LPS, в 100% случаев (Рис. 62а). TM4, однако, не был столь эффективен в предотвращении гибели мышей, вызванной активацией TLR9 – во всех протестированных условиях защита, оказываемая пептидом TM4 от ODN1668-индуцированной гибели, была ниже защиты при применении равной дозы 9R34-ΔN (Рис. 62в, г). Остаточное протективное действие TM4 в предотвращении ODN1668-индуцированной смертности было объяснено вкладом TLR4 в системное воспаление, индуцируемым эндогенными факторами, высвобождаемыми при повреждении тканей (называемыми в англоязычной литературе DAMP (damage-associated molecular patterns)) (Piao, Vogel, et al., 2013b).

Представленные в разделе данные убедительно показывают способность БП оказывать системное ингибиторное действие на индуцированную продукцию цитокинов TLR и существенно снижать смертность в мышинной модели TLR-индуцированного септического шока.

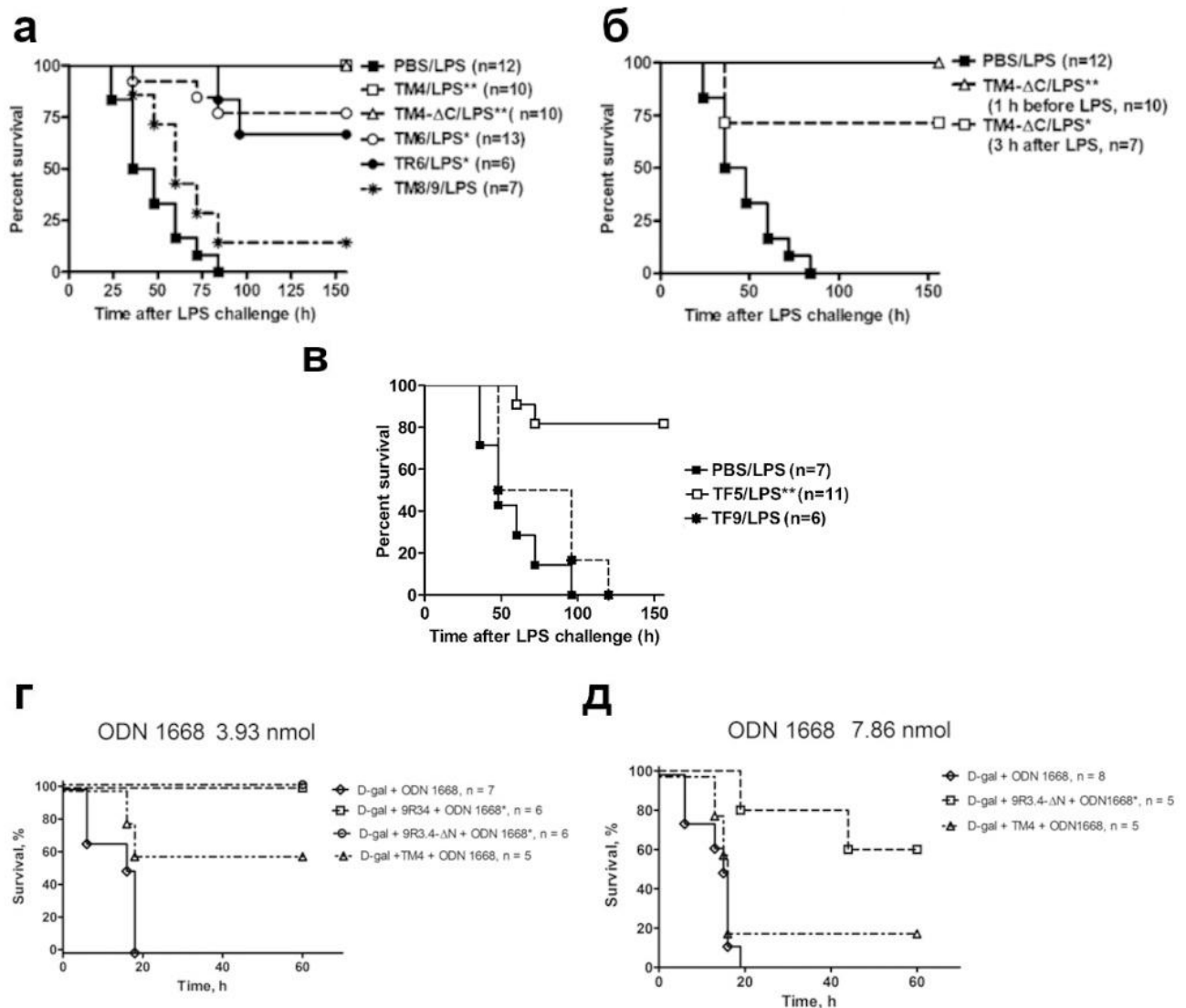


Рисунок 62 — БП способны предотвращать TLR-индуцированную смертность мышей (Javten et al., 2018; Piao, Ru, et al., 2013a; Piao, Vogel, et al., 2013b)

а – влияние ингибирующих пептидов TM4, TM4-ΔC, TM6, TR6 и контрольного пептида TM8 на выживаемость мышей линии C57BL/6J, получивших летальную дозу LPS (17,5 мкг/г). Пептиды вводились ip в дозе 10 нмоль/г за час до введения LPS, что соответствует дозам 38, 32, 41 и 40 мг/кг для пептидов TM4, TM4-ΔC, TM6 и TR6, соответственно

б – сравнение влияния профилактического (за час до введения LPS) и терапевтического введения пептида TM4-ΔC (через 3 часа после введения LPS) на

процент выживаемости мышей, получивших летальную дозу LPS (17,5 мкг/г). Пептиды вводились мышам *ip* в дозе 10 нмоль/г

в, г – влияние БП на смертность, индуцированную сочетанным введением D-галактозамина (D-gal) и ODN1668 в дозе 3,93 (**в**) или 7,86 нмоль/мышь (**г**). D-gal вводился в дозе 20 мг на животное за 30 минут до введения БП в дозе 200 нмоль. ODN1668 вводился *ip* через час после введения пептидов. В экспериментах использовались мыши линии C57BL/6J.

4.4.4 Оценка способности БП модулировать воспалительную реакцию на патогены

Избыточная реакция иммунной системы на присутствие патогена может вызвать цитокиновый шторм и привести к летальному исходу в тяжелых случаях. В связи с этим модуляторы системного цитокинового ответа на патоген могут иметь важное значение как прекурсоры инновационных лекарств для лечения тяжёлых инфекционных заболеваний. TLR являются важным, но не единственным компонентом системы рецепторов врождённого иммунитета, ответственным за обнаружение патогенов и последующую инициацию иммунного ответа. TLR усиливают развитие воспалительной реакции при инфекционных заболеваниях как за счёт прямой детекции молекулярных компонентов самого патогена (называемых в англоязычной литературе PAMP (от англ. pathogen-associated molecular patterns)), так и за счёт активации эндогенными молекулами, не присутствующими в организме в норме, но образующимися вследствие повреждения тканей. Молекулы последней группы, называемые в литературе DAMP (от английского damage-associated molecular patterns), осуществляют значительный вклад в развитие лёгочного воспаления при вирусных инфекциях, главным образом, за счёт активации TLR4 (Imai et al., 2008; Shirey et al., 2013).

В качестве модельного патогена в нашей работе использовался аттенуированный, адаптированный к мышам вирус гриппа, штамм A/PR/8/34 (PR8). Вирус гриппа, представитель одноцепочечных РНК-вирусов, активирует несколько рецепторов системы врождённого иммунитета, однако имеющиеся данные указывают на особо важную роль TLR7 в развитии иммунного ответа на вирус гриппа у мышей (Diebold et al., 2004; Kawai & Akira, 2011; Lund et al., 2004). В качестве модулятора иммунного ответа был выбран пептид 2R9, поскольку этот пептид, во-первых, обладает выраженной способностью блокировать TLR7, что было продемонстрировано нами как в культуре клеток (Рис. 17), так и *in vivo* на мышах (Рис. 58), и, во-вторых, посредством ингибирования TLR4 (Рис. 17) этот пептид способен ингибировать ответ и на эндогенные активаторы воспаления, т.е. DAMP.

Инфицирование перитонеальных макрофагов мышей линии C57BL/6J вирусом вызывало резкий подъём продукции провоспалительных цитокинов в контрольных условиях (Рис. 63а–в). Индуцированная вирусом продукция цитокинов, однако, эффективно подавлялась пептидом 2R9 как в концентрации 20, так и 40 мкМ, но не изменялась в присутствии контрольного пептида (Рис. 63а–в).

Инфицирование вирусом макрофагов, полученных от мышей, дефицитных по гену MyD88, не индуцировало значимой продукции TNF или IL-6 (Рис. 63а, б), что подтверждает ведущую роль TLR в индукции провоспалительных цитокинов в условиях этих экспериментов. Индуцированная вирусом продукция IFN- β , однако, была снижена в MyD88-дефицитных клетках в меньшей степени в сравнении с TNF или IL-6 (Рис. 63а–в), что по всей видимости отражает больший вклад других рецепторов системы врождённого иммунитета (в частности, RIG-I или MyD88-независимой, TRIF-зависимой ветви TLR4) в индукцию интерферонов первого типа РНК-вирусами (Kato et al., 2005). Тем не менее, продукция

IFN- β была достоверно снижена в присутствии 2R9 в инфицированных макрофагах дикого типа (Рис. 63в).

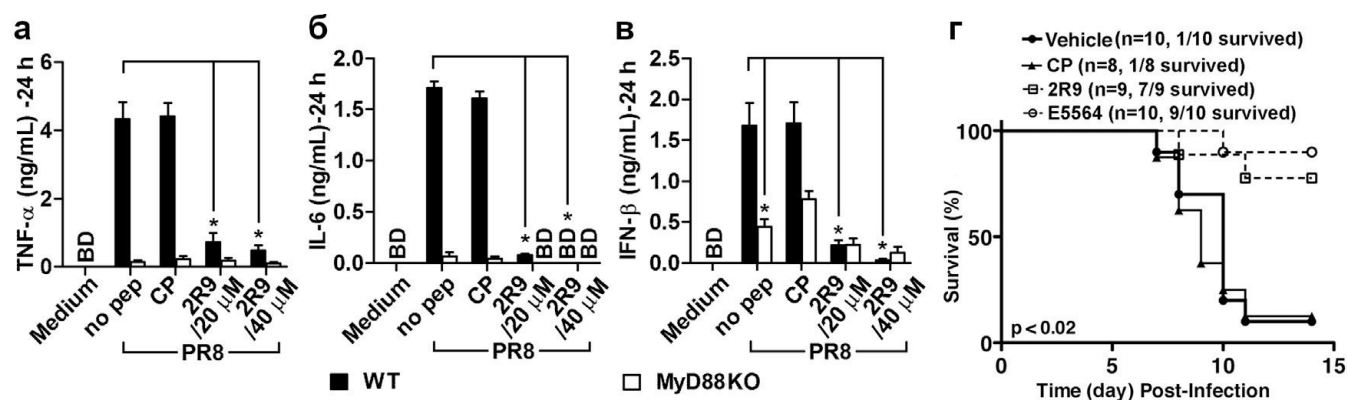


Рисунок 63 — Пептид 2R9 снижает MyD88-зависимую продукцию цитокинов в культуре инфицированных вирусом гриппа макрофагов (а–в) и увеличивает выживаемость мышей, заражённых летальным штаммом вируса гриппа (Piao et al., 2015)

а–в – влияние пептида 2R9 на содержание цитокинов в супернатантах первичных культур перитонеальных макрофагов, полученных от мышей линии C57BL/6J дикого типа (чёрные столбцы) или мышей с нокаутом MyD88 (белые столбцы). Продукцию цитокинов индуцировали заражением культуры вирусом гриппа (штамм PR8). Клетки инкубировались в присутствии вируса в дозе 1 MOI в течении 2-х часов в стандартных культуральных условиях. По истечении инкубации с вирусом, среда культивации заменялась на свежую пептид-содержащую или контрольную среду. Отбор супернатантов для измерения содержания цитокинов осуществлялся через 24 часа после инфицирования клеток.

г – влияние пептида 2R9 на выживаемость мышей линии C57BL/6J, инфицированных штаммом PR8 вируса гриппа. Мыши линии C57BL/6J получали интраназальный инокулят вируса в дозе $\sim 7,500$ TCID₅₀, что вызывало $\sim 90\%$ -ю смертность в контрольной группе (LD₉₀). Начиная со второго дня после инокуляции, мыши получали пятидневный курс ежедневных инъекций пептида 2R9 (200 нмоль), контрольного пептида (200 нмоль), ингибитора TLR4 липидной природы Эриторана (E5564) (200 мкг) или PBS. Эриторан вводился животным iv. Пептиды вводились ip.

В следующей серии экспериментов было протестировано влияние пептида 2R9 на течение гриппа у мышей. Мыши получали интраназальный инокулят вируса гриппа штамма PR8 (~7,500 TCID₅₀), что вызывало 90% смертность в контрольной группе мышей (Shirey et al., 2013). Пептид 2R9 вводился мышам в дозе 200 нмоль однократными, ежедневными *ip* инъекциями в течение пяти дней, начиная со 2-го дня после инокуляции вируса. Контрольные группы получали либо контрольный пептид (CP), не способный блокировать TLR, в дозе 200 нмоль, либо PBS. Выживаемость мышей, получивших CP или PBS, составляла 12,5% и 10%, соответственно, тогда как в группе мышей, получавших 2R9, выживало 78% (Рис. 63г). Различие выживаемости между 2R9 и обеими контрольными группами было статистически достоверно ($p < 0,02$ согласно тесту Мантеля-Кокса).

Полученные данные убедительно показывают способность БП подавлять системный цитокиновый ответ, индуцированный активацией TLR *in vivo* в мышах. Благодаря этой способности наиболее активные ингибиторы способны предотвращать гибель животных, индуцированную LPS или синтетическими агонистами других TLR, а также снижать смертность при острых инфекционных заболеваниях за счёт модуляции цитокинового ответа на присутствие патогена.

4.5 Идентификация функциональных сайтов связывания TIR доменов посредством анализа эволюционной сохранности их аминокислотных последовательностей

Ортологичные белки в подавляющем большинстве случаев сохраняют предковые функции на протяжении сотен миллионов лет эволюционной истории. Это свойство вместе с происходящим в последние два десятилетия экспоненциальным ростом числа известных белковых последовательностей позволило выявление функционально значимых мотивов белковых последовательностей методами биоинформатики на основании анализа вариабельности аминокислотных последовательностей

белков-ортологов. Нами было предпринято исследование вариативности последовательностей TIR доменов, представленных на момент исследования в открытых базах данных, с целью идентификации мотивов, определяющих функцию TIR доменов белков различных семейств (Toshchakov & Neuwald, 2020). В исследовании использовался подход, называемый Байесова классификация с отбором мотивов (Bayesian partition with pattern selection (BPPS)) (Neuwald, 2014a, 2014c). Применённый в исследовании программный пакет способен строить иерархические классификации большого числа белковых последовательностей на основании алгоритмически определяемых мотивов, которые наиболее достоверно различают категории полученной иерархической классификации, и идентифицирует мотивы, характерные для каждой из групп классификации (Neuwald, 2014a, 2014b, 2014c).

На первом этапе работы с помощью программы MAPGAPS (Neuwald, 2009) было идентифицировано 26414 уникальных белковых последовательностей TIR доменов, опубликованных в открытых базах данных на момент исследования. Из них 9271 последовательность представляли бактериальные TIR домены, 6434 TIR домены метазой, 9522 домены высших растений (Рис. 64б). Кроме того, были обнаружены 118 TIR доменов архей, 292 TIR домена протозой, 16 доменов зелёных водорослей, а также 758 филогенетически не классифицированных последовательностей (Рис. 64б). Применение алгоритма BPPS к обнаруженному множеству последовательностей позволило выделить 36 групп TIR доменов, 6 из которых было разбито на подгруппы (Рис. 64а).

Состав отдельных групп классификации различался таксономически. 22 группы содержали или бактериальные TIR домены, или таксономически не классифицированные TIR домены, последовательности которых были определены в результате секвенирования ДНК, выделенной из природных образцов (Toshchakov and Neuwald 2020). 13 групп были образованы TIR доменами эукариот (Рис. 64с) (Toshchakov and Neuwald 2020). Одна группа

классификации, группа 17, содержала некоторое количество TIR доменов простейших в дополнение к TIR доменам белков прокариот (Рис. 64с) (Toshchakov and Neuwald 2020). TIR домены высших растений образовывали 3 из 13 эукариотических групп, тогда как 9 групп представляли TIR домены метазой (Рис. 64с) (Toshchakov and Neuwald 2020). Одна группа эукариотических TIR доменов, группа 18, большинство TIR доменов которой таксономически представляли низших метазой, также содержала и TIR домены простейших (Рис. 64е) (Toshchakov and Neuwald 2020).

Каждая из групп TIR доменов метазой, за исключением группы 18, характеризовалась определённой доменной архитектурой — такие группы целиком были образованы белками-ортологами, или представляли семейство белков (Рис. 64е). Три из 10 групп TIR доменов животных представляли TLR. Самая большая группа TIR доменов TLR (группа 3) включала в себя TIR домены TLR1–6, а также домены TLR10 и Toll белков насекомых (Рис. 64д). Группа 7 была образована доменами эндоплазматических TLR, функция которых заключается в детекции нуклеиновых кислот вирусной или бактериальной природы (TLR7, TLR8 и TLR9). TIR домены TLR11–13 образовывали третью группу TIR доменов TLR — группу 29. TIR домены группы 29 характеризуются неоднородным присутствием у хордовых — кодирующие их гены присутствуют в геномах грызунов и копытных, но отсутствуют у приматов и псовых (Roach et al., 2005).

TIR домены адаптерных белков кластеризовались в отдельные группы: TIR домены адаптера TIRAP образовывали группу 10, а TIR домены TRIF группу 32 (Рис. 64д). Адаптеры TIRAP и TRIF (и, соответственно, TIR домены групп 10 и 32) обнаруживаются исключительно у позвоночных (Рис. 64д), тогда как MyD88 присутствует и у беспозвоночных. TIR домены MyD88 образовывали 2 группы: домены артропод формировали группу 32, тогда

как TIR домены адаптера MyD88 остальных метазой, включая хордовых, кластеризовались в группу 23 (Рис. 64д).

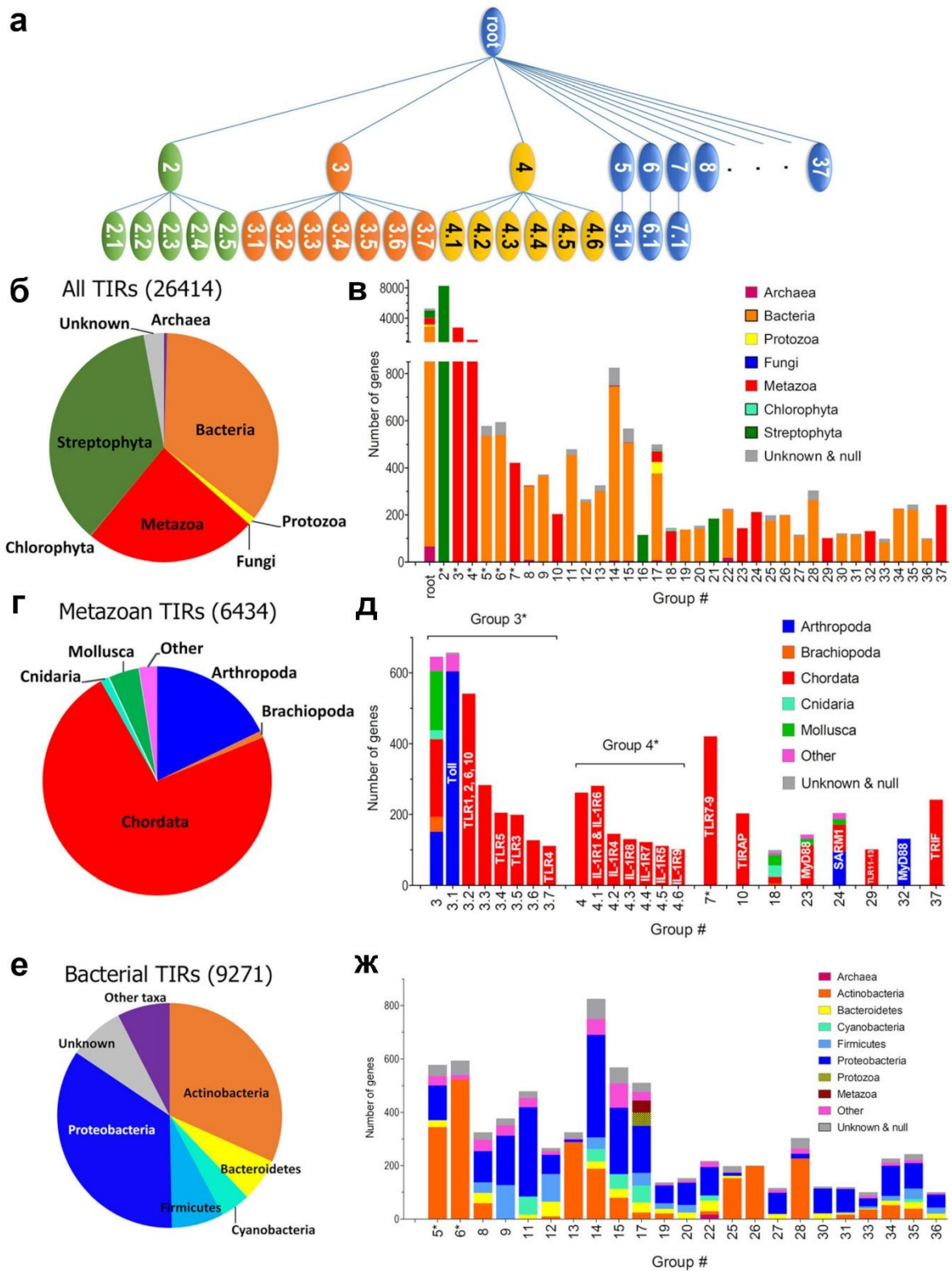


Рисунок 64 — Иерархическая классификация и таксономический состав отдельных групп TIR доменов (Toshchakov & Neuwald, 2020)

а – Байесова классификация TIR доменов

б – таксономическая характеристика пула идентифицированных последовательностей TIR доменов. TIR домены высших растений, животных и бактерий представлены приблизительно в равной степени в общем пуле

в – филогенетический и количественный состав отдельных групп классификации. TIR домены высших растений (зелёные столбцы), животных (красные столбцы) и бактерий (светло-коричневые столбцы) выделяются в отдельные группы. Исключение составляет группа 17, которая, наряду с составляющими большинство бактериальными доменами, содержит TIR домены простейших, а также некоторое число доменов низших метазой (Toshchakov & Neuwald, 2020)

г – таксономическая представленность TIR доменов метазой в классификации

д – детальный таксономический состав групп TIR доменов метазой. За исключением группы 18, большинство которой представлено TIR доменами низших метазой, отдельные группы образованы или белками-ортологами или белковыми семействами, характеризующимися общей доменной архитектурой. Название характерных белков, образующих группу или подгруппу, указано на колонках. Таксономические группы, представляющие менее 3% доменов отдельных групп, объединены в категорию “Other”

е – таксономическая представленность бактериальных TIR доменов

ж – таксономический состав групп бактериальных TIR доменов. Бактериальные группы, в отличие от эукариотических групп, содержат TIR домены белков различной доменной архитектуры. Таксономический состав групп смешанный, однако можно отметить и некоторые общие закономерности. Например, TIR домены цианобактерий кластеризуются вместе с доменами протеобактерий (Toshchakov & Neuwald, 2020).

Группы прокариотических TIR доменов, в отличие от большинства групп TIR доменов животных, представляли белки, характеризующиеся различной доменной архитектурой, что отражает полифилетичность прокариотических групп классификации (Рис. 64ж). Вместе с тем, более 95% групп 6, 13 и 26 составляли TIR домены актинобактерий, а большинство групп 11, 27, 30 и 31 составляли протеобактериальные домены (Рис. 64ж). Наибольшее процентное содержание генов архей, 8%, наблюдалось в группе 22 (Рис. 64ж). Поскольку изучение бактериальных и

растительных TIR доменов не входило в цели настоящего диссертационного исследования, дальнейшее изложение результатов будет сфокусировано на TIR доменах TLR и адаптеров, передающих сигнал с активированных TLR.

4.5.1 Мотивы аминокислотных последовательностей, общие для TIR доменов

Для идентификации мотивов, характеризующих функцию специализированных групп TIR доменов, таких как TIR домены TLR или домены адаптерных белков млекопитающих, необходимо понимание мотивов общих для всех TIR доменов как одного из основных классов белковых доменов. Рисунок 65 демонстрирует контрастное выравнивание, характеризующее 25 позиций, наиболее отличающих TIR домены от остального протеома (Рис. 65а) (Toshchakov & Neuwald, 2020). Наиболее консервативными в TIR доменах являются позиции, располагающиеся в трёх β -тяжах, формирующих сердцевину TIR домена (β A, β C, и β D), тогда как последовательности краевых тяжей β -листа (β B, и β E) вариабельны (Рис. 65а–с). Ещё три аминокислотных остатка мотива, специфичного для всех TIR доменов, (позиции 48, 52 и 55) располагаются перед β -тяжом C (β C) на обращённой внутрь стороне второй α -спирали (α B) (Рис. 65а). Эти аминокислотные остатки обеспечивают взаимодействие α B с гидрофобным листом и другими элементами внутренней структуры домена.

Тирозин или фенилаланин присутствуют в позиции 66 более чем в половине TIR доменов (Рис. 65а, г). Этот аминокислотный остаток взаимодействует с тремя остатками мотива, располагающимися в β C, включая серин или треонин, присутствующие в позиции 63 с вероятностью более чем 0,7 (S/T₆₃) (Рис. 65а, г). S/T₆₃ образует две водородные связи с атомом азота Y/F₆₆ (Рис. 65г). Таким образом, наиболее вероятным функциональным значением S/T₆₃ и Y/F₆₆ представляется стабилизация

резкого поворота полипептидной цепи после β C для обеспечения корректного сворачивания TIR доменов.

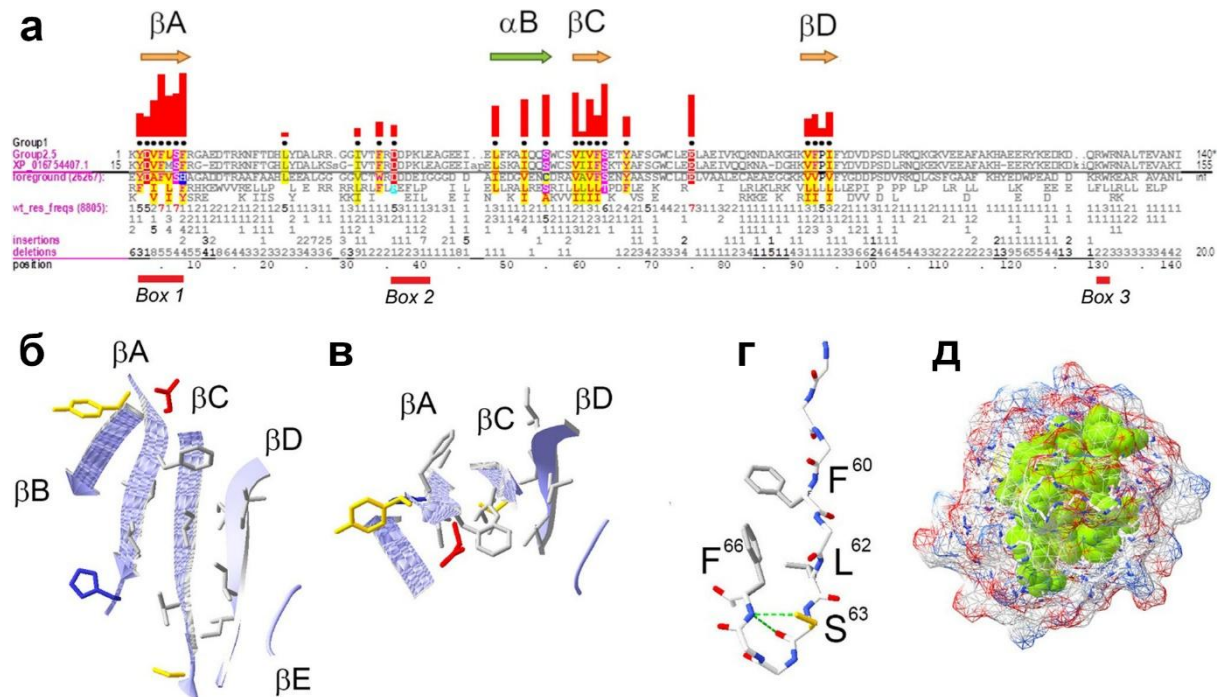


Рисунок 65 — Мотивы аминокислотных последовательностей и структурные особенности, характеризующие TIR домены как один из основных классов белковых доменов (Toshchakov & Neuwald, 2020)

а – контрастное выравнивание последовательностей TIR доменов. Черные кружки поверх последовательностей указывают 25 позиций, характеризующих выбранную группу иерархии (Group 1 соответствует корневой группе, включающей все 26414 последовательности проанализированных TIR доменов). Высота красных столбцов показывает в относительных единицах эволюционное давление (selective constraint) (Neuwald et al., 2003; Toshchakov and Neuwald 2020), оказываемое на отдельные позиции мотива. Две приведённые последовательности выравнивания показывают консенсусную последовательность одной из групп иерархии и пример последовательности TIR домена данной 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 and Neuwald 2020).

б, в – показанный в двух проекциях центральный β -лист TIR домена бактериального белка TcrB (pdb ID: 4lqc). Боковые цепи показаны только для аминокислотных остатков, принадлежащих к TIR-специфичному мотиву. Аминокислотные остатки, образующие TIR-специфичный мотив, формируют три некраевых β -тяжа, образующих сердцевину домена.

г – взаимодействия эволюционно сохраненных аминокислотных остатков S/T₆₃ и Y/F₆₆ стабилизируют петлю CC TIR доменов. S/T₆₃ образует 2 водородные связи с атомом азота основной цепи в позиции 66, а ароматическое кольцо Y/F₆₆ взаимодействует с гидрофобными аминокислотными остатками третьего β -тяжа. На рисунке показаны аминокислотные остатки 698–707 ТПР2 человека (pdb ID: 1FYW) (Xu et al., 2000).

д – аминокислотные остатки, формирующие общий для TIR доменов мотив, образуют 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).

Остаток глутаминовой кислоты присутствует в 75-ой позиции более чем в 70% всех TIR доменов (Рис. 65а). Этот остаток является частью каталитического центра TIR доменов, обладающих НАДазной активностью (Essuman et al. 2017, 2018; Horsefield et al. 2019; Wan et al. 2019). Однако, глутаминовая кислота в этой позиции присутствует не только в TIR доменах, обладающих НАДазной активностью. Так, E75 обнаруживается более чем в 90% последовательностей TIR доменов TLR, функционирующих как гетеродимеры (группа 3.2 классификации, сформированная доменами TLR1, TLR2, TLR6 и TLR10) (Toshchakov and Neuwald 2020). E75, однако, встречается менее чем в 10% последовательностей эндосомальных TLR (группа 7), а также в TIR доменах адаптеров TIRAP и MyD88 (группы 10 и 23, соответственно) (Toshchakov and

Neuwald 2020). Высокая частота встречаемости E75 как в группах, обладающих НАДазной активностью, так и в некоторых каталитически неактивных доменах взаимодействия, указывает на то, что этот остаток может играть не только каталитическую, но и структурную роль, вероятно определяя процесс сворачивания домена. За исключением E75, остальные аминокислоты TIR-специфического мотива образуют сердцевину TIR доменов, не экспонированы на поверхности доменов и, соответственно, не могут определять специфичность белок-белковых взаимодействий (Рис. 65д). Мотивы, определяющие специфичность TIR-TIR взаимодействий, таким образом, специфичны для отдельных подгрупп классификации и будут рассмотрены ниже для классов TIR доменов, которые изучались экспериментально в нашей работе.

4.5.2 Мотивы аминокислотной последовательности, характерные для TIR доменов TLR1–6 и TLR10

Большинство TIR доменов группы 3 полученной иерархической классификации составляли TIR домены TLR хордовых (Рис. 64а, д). В группу также входили TIR домены Toll белков артропод, которые вместе с представителями других низших метазой образовывали подгруппу 3.1 (Рис. 64д). TIR домены TLR хордовых образовывали остальные подгруппы группы 3. Подгруппа 3.2 состояла из TIR доменов TLR, которые функционируют как гетеродимеры (TLR1, TLR2, TLR6 и TLR10) (Рис. 64д). TIR домены TLR5 образовывали подгруппу 3.4, TLR3 подгруппу 3.5, а TLR4 подгруппу 3.7 (Рис. 64д) (Toshchakov and Neuwald 2020). Следует отметить, что группа 3 объединяла не все известные TLR. Так, TLR, которые экспрессируются на эндосомальных мембранах (ортологи TLR7, TLR8 и TLR9), образовывали отдельную группу классификации, группу 7, а TIR домены TLR11–13 (эти TLR не присутствуют у человека) формировали группу 29 (Рис. 64д).

Среди аминокислотных остатков, образующих мотив, характерный для группы 3, можно выделить 3 кластера взаимодействующих между собой остатков (Рис. 66д).

Кластер аминокислотных остатков, расположенных вблизи тяжа β В. Первый из кластеров, характерных для TIR доменов группы 3, расположен в районе краевого β -тяжа В (β В) и имеет последовательность - E₈-(X-X)-X[6]-C₉-X-H₆-X-R₉-D₈-F₇-X-X-G₉- (подстрочные символы показывают округлённую до меньшего частоту встречаемости элементов мотива в десятках процентов). Фрагмент последовательности, включающий этот кластер, выделен красным прямоугольником под выравниванием рисунка 66а, а также показан на рисунках 66б и 66в. Первый аминокислотный остаток мотива, E23, располагается на С-конце α -спирали А (α А). E23 присутствует более чем в 80% последовательностей группы, тогда как в других более чем 10% случаев эту позицию занимает остаток аспарагиновой кислоты (Рис. 66а). За E23 следует переменная петля АВ, и располагающийся в β В С32 присутствует более чем в 90% последовательностей TLR этой группы (Рис. 66а). Положительно заряженная аминокислота мотива (R36) образует солевые мостики с двумя отрицательно заряженными остатками мотива (E23 и D37) (Рис. 66в). Можно отметить, что аналогичный короткий мотив, состоящий из трёх заряженных аминокислотных остатков, присутствует и в TIR доменах цитокиновых рецепторов, а также у адаптерных белков MyD88-зависимого пути (группы 4, 10 и 23 классификации), что указывает на функциональную значимость этого мотива (Toshchakov & Neuwald, 2020). Было предложено, что функция данного мотива заключается в создании дополнительного слоя атомов, укрывающего край β -листа и предотвращающего неспецифические взаимодействия с другими β -белками (Richardson & Richardson, 2002; Toshchakov & Neuwald, 2020).

Кластер аминокислотных остатков, расположенных вблизи тяжа βE . Тяж β -листа βE , формирующий противоположный к βB край β -листа, также является особенностью, характеризующей рассматриваемый класс TIR доменов. Характерная аминокислотная последовательность этого региона: $-Y_7-I/L_8-X-W_8-P_5-$ (Рис. 66а). Боковые цепи I/L_{119} и W_{121} мотива βE располагаются на вогнутой стороне β -листа, обращённой к α -спиралям A и E. W_{121} взаимодействует с тремя другими ароматическими остатками, каждый из которых присутствует в подавляющем большинстве TIR доменов этого класса (Рис. 66а, г). Ароматическое кольцо W_{121} взаимодействует с ароматической группой W_6/F_{213} , располагающейся на внутренней стороне α -спирали A, а также с F_{8129} и W_{8130} спирали αE (Рис. 66г). Эти, характерные для группы 3.2, 4 ароматических остатка расположены удалённо в первичной последовательности, но взаимодействуют в третичной структуре, образуя структуру, в которой ароматические кольца находятся в близкой к перпендикулярной друг к другу ориентации (Рис. 66г). Следует отметить, что аналогичная четырёхкольцевая ароматическая структура также была нами обнаружена и в TIR доменах цитокиновых рецепторов (Toshchakov and Neuwald 2020).

Гидрофобные аминокислотные остатки региона между β -тяжами C и D. Три гидрофобных аминокислотных остатка составляют третий мотив, характерный для TIR доменов этой группы. 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 (Рис. 66а, б и д). 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 and Neuwald 2020).

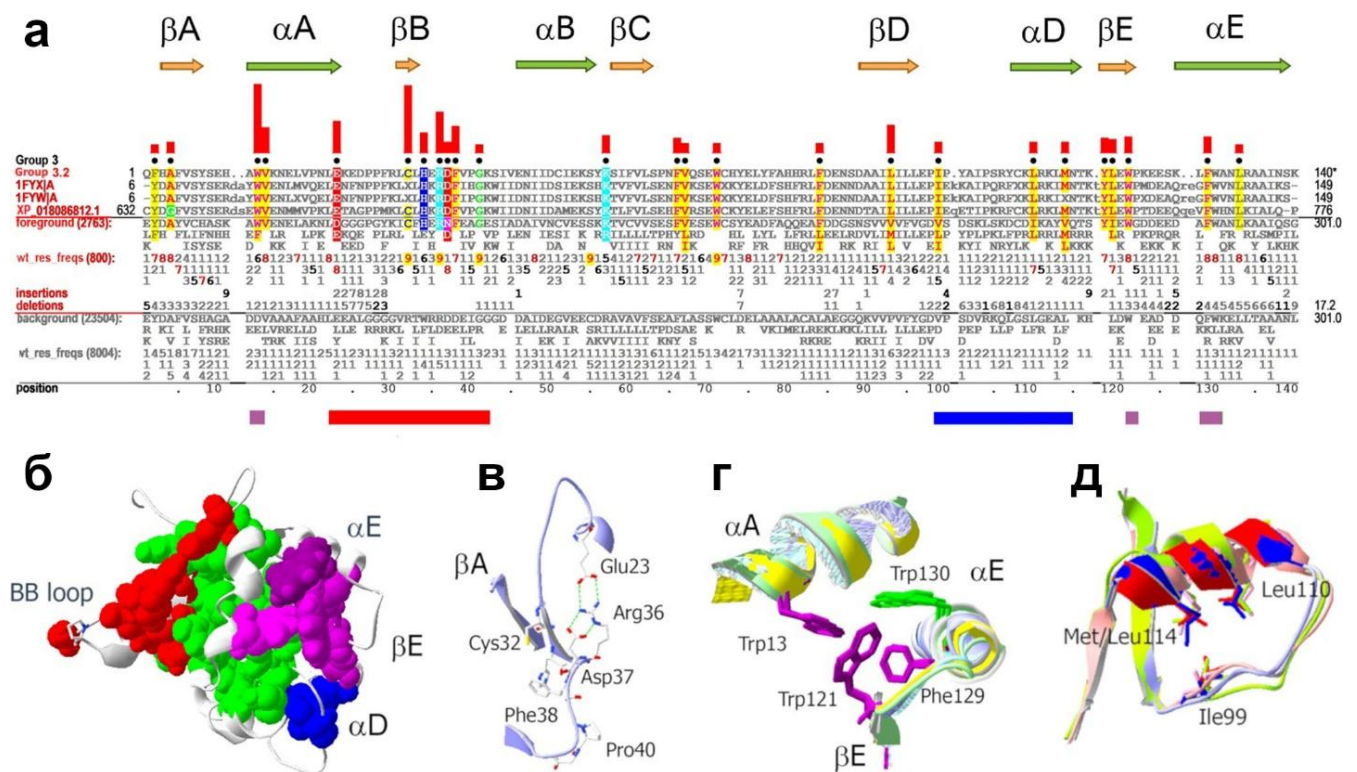


Рисунок 66 — Мотивы аминокислотных последовательностей и структурные особенности, характеризующие TIR домены TLR1–6 и TLR10 (Toshchakov and Neuwald 2020)

а – контрастное выравнивание последовательностей TIR доменов группы 3, включающей в себя TIR домены TLR1–6, TLR10, а также Toll белки артропод (Рис. 64д). Черные кружки поверх последовательностей указывают 25 позиций, характеризующих данную группу иерархии. Горизонтальные стрелки над последовательностями указывают элементы вторичной структуры. Горизонтальные прямоугольники под последовательностями показывают кластеры аминокислотных остатков, образующих характерные для данного класса элементы структуры, также показанные в соответствующих цветах в панели 66б.

б – модель TIR домена TLR2 человека (PDB ID: 1FYW). 3 кластера, специфичных для группы 3 аминокислотных остатков, выделены красным, синим и фиолетовым цветами. Аминокислотные остатки, образующие 3 кластера, показаны и в панели 66а (подчеркнуты горизонтальными прямоугольниками соответствующего цвета). Аминокислотные остатки мотива, общего для всех TIR доменов, выделены зеленым. Боковые цепи показаны только для аминокислотных остатков, принадлежащих к общему

для всех TIR доменов мотиву (выделены зелёным), а также для трёх кластеров, специфичных для группы 3.

в – расположенный в районе краевого β -тяжа β B аминокислотный кластер, присутствующий в TIR доменах группы 3, имеет последовательность -E₈-x-(x-x)-x[5]-C₉-x-H₆-x-R₉-D₈-F₇-x-x-G₉- (подстрочные символы указывают округлённую до меньшего частоту встречаемости элементов мотива в десятках процентов). Этот мотив также показан (выделен красным) в панелях **а** и **б** рисунка 66. На рисунке показаны аминокислотные остатки 664–683 ТПР2 человека (pdb ID: 1FYW) (Xu et al., 2000).

Боковые цепи аминокислотных остатков, не принадлежащих к мотиву, специфичному для TIR доменов группы 3, не показаны. Не принадлежащий к кластеру β -тяж А включен, чтобы показать ориентацию кластера по отношению к β -листу.

г – кластер ароматических аминокислотных остатков, расположенных удаленно в первичной последовательности доменов, но взаимодействующих в третичной структуре домена. Ароматические кольца ориентированы перпендикулярно друг другу и взаимодействуют по Т-типу π – π -стэкинга (McGaughey et al., 1998). Аминокислотные остатки, формирующие этот кластер, выделены фиолетовым цветом в панелях **а** и **б** рисунка 66.

д – гидрофобные аминокислотные остатки мотива, располагающиеся в петле DD и α -спирали D, обеспечивают связь α -спирали D с гидрофобным ядром домена и, по-видимому, отвечают за характерную для группы 3 перпендикулярную ориентацию α -спирали D по отношению к тяжам β -листа (Toshchakov & Neuwald, 2020).

4.5.3 Мотивы аминокислотной последовательности, характерные для TIR доменов TLR7–9

TIR домены TLR7, TLR8 и TLR9 составляли 7-ю группу иерархии (Рис. 64а, д) (Toshchakov and Neuwald 2020). TLR7–9 экспрессируются на эндосомальных мембранах и являются сенсорами присутствия нуклеиновых кислот бактериальной и вирусной природы (Kawai & Akira, 2011). TLR7 и TLR8 распознают присутствие одноцепочечной вирусной РНК (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Lund et al., 2004), тогда как TLR9

активируется неметилованной ДНК бактериальной или вирусной природы, содержащей CpG-мотивы (Bauer et al., 2001; Hemmi et al., 2000). TIR домены группы 7 обнаруживались исключительно в геномах хордовых (Рис. 64д).

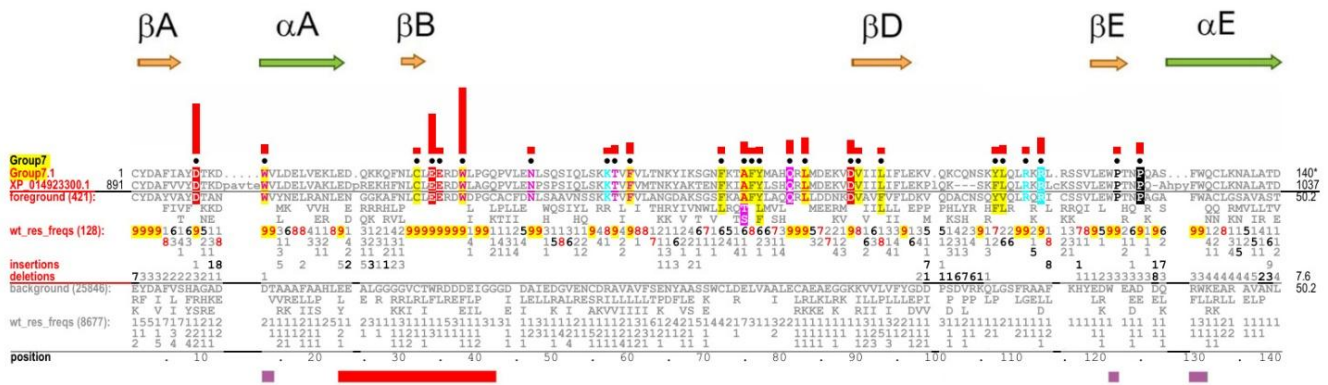


Рисунок 67 — Мотивы аминокислотных последовательностей, характерные для TIR доменов TLR7–9 (Toshchakov and Neuwald 2020)

Показано контрастное выравнивание последовательностей TIR доменов группы 7, включающей в себя TIR домены TLR7–9 позвоночных (Рис. 64д). Черные кружки поверх последовательностей указывают 25 позиций, отличающие данную группу от остальных групп классификации. Горизонтальные стрелки над последовательностями указывают элементы вторичной структуры домена. Горизонтальные прямоугольники под последовательностями показывают кластеры аминокислотных остатков, образующих характерные элементы структуры, аналогичные показанным в соответствующих цветах на рисунке 66.

Наиболее характерным для данной группы фрагментом последовательности является участок петли ВВ, имеющий последовательность $-E_9E_9R_9D_9W_9-x-P_9G_9-$ (Рис. 67). Семь из восьми позиций этого участка занимают аминокислотные остатки, встречающиеся в группе с частотой $>90\%$, причем E34 и W38 являются наиболее

характерными для данной группы, т.е. не встречаются в других группах со столь высокой частотой (Рис. 67). Блокирующий пептид, соответствующий этому участку последовательности TLR9, эффективно блокировал TLR9-индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов в экспериментах на культуре клеток и на мышах (Рис. 20, 59). Другим характерным для эндосомальных TLR аминокислотным остатком является аспарагиновая кислота в 9-й позиции, а также специфичные для группы 7 последовательности третьей и четвёртой α -спиралей (Рис. 67). Ввиду того, что к настоящему времени трёхмерная структура экспериментально не определена ни для одного из представителей TIR доменов группы 7, интерпретация функционального значения характерных для группы участков последовательности затруднена и требует дополнительных исследований.

4.5.4 Эволюционно сохранные аминокислотные остатки и структурные особенности, характерные для TIR доменов адаптера MyD88

MyD88 – это адаптерный белок, участвующий в передаче сигнала двумя крупными семействами рецепторов иммунной системы: TLR и цитокиновыми рецепторами семейства рецептора IL-1. TIR домены MyD88 образовали две группы иерархии: группы 23 и 32 (Рис. 64д). TIR домены MyD88 хордовых составляли большинство доменов, образующих группу 23 (Рис. 64д). В группу 23 также входили TIR домены MyD88 беспозвоночных за исключением доменов артропод, которые образовывали отдельную группу иерархии, группу 32 (Рис. 64д) (Toshchakov and Neuwald 2020). Мотивы аминокислотной последовательности, свойственные TIR доменам MyD88, а также структурные особенности, характерные для доменов группы 23, показаны на рисунке 68.

Последовательность третьего и четвёртого α -спиральных участков (α C и α D), а также пятого β -тяжа (β E), наиболее отличают TIR домены

MyD88 хордовых от других TIR доменов (Рис. 68). Упомянутые мотивы обозначены на рисунке 68а прямоугольными подчёркиваниями соответственно зелёного, синего и фиолетового цвета, а также показаны теми же цветами в структурных моделях рисунков 68в, 68г и 68д. Можно отметить, что положение всех трёх MyD88-специфичных мотивов соответствует сайтам взаимодействия TIR доменов, осуществляющих рекрутирование адаптеров при активации TLR (Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020; Ve et al., 2017), тогда как последовательность четвёртого сайта, располагающегося в районе β -тяжа В (β B), сходна с гомологичными последовательностями группы 3 (большинство TLR), группы 4 (TIR домены рецепторов цитокинов) и группы 10 (TIR домены адаптера TIRAP), однако отличается укладкой цепи, что указывает на конформационную подвижность этого участка TIR домена.

Самый большой из характерных для группы 23 кластеров соответствует третьему спиральному участку TIR домена, который у MyD88 человека состоит из 3-х α -спиралей α C', α C'' и α C''' (Рис. 68а и г). Каждый из поверхностно расположенных остатков центральной спирали мотива (-D₉F₉-х-х-K₉-х(3)-S₈-) специфичен для TIR доменов MyD88 (Рис. 68а); и все эти остатки вместе образуют один из четырёх сайтов, осуществляющих TIR-TIR взаимодействия при активации TLR ((Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020; Ve et al., 2017). Согласно предложенной нами номенклатуре, этот сайт обозначается как сайт 2 (Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020) (Табл. 3).

Эволюционно сохранный участок доменов группы 23, который расположен между четвёртым и пятым β -тяжами (β D и β E, соответственно), имеет характеристическую последовательность -F₇P₉S₇I₉L₉R₉F₇-φ-T₉- (Рис. 68а). Было предложено, что этот мотив осуществляет гомотипические (MyD88–MyD88) и гетеротипические TIR–TIR взаимодействия MyD88 с TIRAP, TLR, или с рецепторами семейства IL-1R (Clabbers et al., 2021;

Javmen et al., 2018). Этот участок (сайт 3, согласно предложенной нами классификации сайтов TIR–TIR связывания (Toshchakov & Javmen, 2020) (Табл. 3)) непосредственно взаимодействует с сайтом 2, включающим в себя третий и, в некоторых случаях, второй спиральный участок TIR доменов (Clabbers et al., 2021; Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020) (Табл. 3).

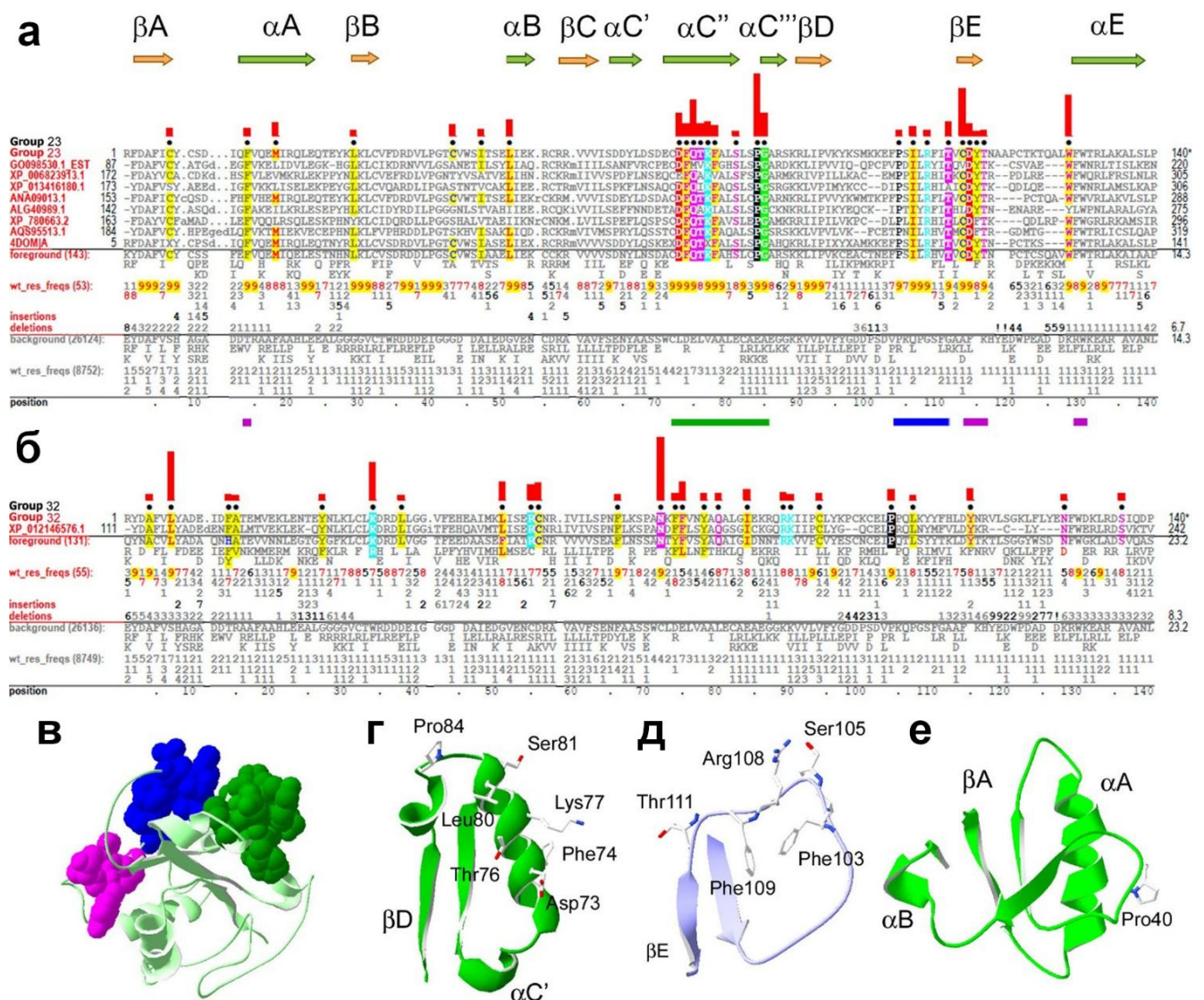


Рисунок 68 — Мотивы аминокислотной последовательности, характерные для TIR доменов адаптера MyD88 (Toshchakov and Neuwald 2020)

а – контрастное выравнивание последовательностей TIR доменов группы 23, включающей в себя TIR домены MyD88 хордовых и беспозвоночных, исключая домены артропод (Рис. 64д). Черные кружки поверх последовательностей указывают 25 позиций, характеризующих данную группу иерархии. Горизонтальные стрелки над последовательностями указывают элементы вторичной структуры. Горизонтальные прямоугольники под последовательностями показывают кластеры аминокислотных остатков, образующих характерные для данного класса элементы структуры, также показанные в соответствующих цветах в панели 68в.

б – контрастное выравнивание последовательностей TIR доменов группы 32, образованной TIR доменами MyD88 артропод (Рис. 64д). Черные кружки поверх последовательностей указывают 25 позиций, характеризующие данную группу иерархии.

в – структура TIR домена MyD88 человека – представителя группы 23 (PDB ID: 2JS7). 3 кластера специфичных для группы 23 аминокислотных остатков выделены зелёным, синим и фиолетовым цветами. Аминокислотные остатки, образующие 3 кластера, показаны и в панели 68а (подчеркнуты горизонтальными прямоугольниками соответствующего цвета). Боковые цепи показаны только для аминокислотных остатков, принадлежащих к трём кластерам мотива, общего для доменов группы 23.

г – расположенный в районе третьего спирального участка аминокислотный кластер, характерный для TIR доменов группы 23, имеет последовательность -D₉F₉Q₉T₈K₉F₉A₉-L₇S₈L₉-X-P₉G₉- (подстрочные символы указывают округлённую до меньшей частоту встречаемости аминокислот мотива в десятках процентов). Этот мотив также показан (выделен зелёным) в панелях **а** и **в** рисунка 68.

д – кластер аминокислотных остатков, расположенных между β-тяжами C и D. Аминокислотные остатки, формирующие этот кластер, выделены синим цветом в панелях **а** и **в** рисунка 68.

е – структура петли BB TIR домена группы 23 (PDB ID: 2JS7).

Участок, формирующий 5-й тяж β-листа (βE) имеет характерную, специфичную для TIR доменов этой группы последовательность (-C₉D₉Y₈T₉-) (Рис. 68а). Эти аминокислотные остатки располагаются на краевом тяжё β-листа, и их боковые цепи экспонированы на поверхности домена. C113 и Y115 также взаимодействуют с ароматическими

аминокислотными остатками F129, W130 и F14, образуя сеть π – π и серо-ароматических взаимодействий, аналогичную сети, характерной для доменов групп 3 и 4 и показанной на рисунке 66г.

Несмотря на то, что в экспериментально разрешенных структурах TIR домена MyD88 укладка участка цепи в районе тяжа β B существенно отличается от таковой в известных структурах доменов TLR или TIRAP (Рис. 66в, 68е (Toshchakov & Javmen, 2020), основные элементы характерной последовательности этого участка сходны. Так, во всех группах доменов, функционирующих в связке с MyD88 (TIR домены самого MyD88 (группа 23), а также TIRAP (группа 10), TLR (группы 3, 7 и 29) и рецепторов семейства IL-1R (группа 4)) (Рис. 64д), присутствует характерный мотив -23E-(x)_n-R-D-(x)₂-P-41G- (Toshchakov & Javmen, 2020). Сохранность этого сайта у TIR доменов MyD88 и его присутствие в других белках сигнальных путей, использующих MyD88, подтверждает его функциональную значимость. На основании структурных данных, а также ингибиторных свойств и специфичностей связывания пептидов, происходящих из соответствующих сайтов, было предложено, что сайт, расположенный в районе тяжа β B (сайт 1 (Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020) (Табл. 3)), взаимодействует с сайтом, располагающимся вблизи другого краевого тяжа β -листа (β E) (сайт 4) (Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020; Ve et al., 2017).

4.5.5 Эволюционно сохраненные участки последовательности и структурные особенности, характерные для TIR доменов адаптера TIRAP

TIRAP – однодоменный адаптерный белок, участвующий в передаче сигнала с TLR. TIRAP необходим для активации MyD88-зависимого сигнального пути рецепторами TLR2 и TLR4 (Horng et al., 2002) и играет вспомогательную, усиливающую передачу сигнала роль при активации

некоторых других TLR, использующих MyD88 в качестве адаптерного белка (Bonham et al. 2014; Piao et al. 2015).

Анализ межвидовой вариабельности последовательностей TIR доменов адаптера TIRAP выявил несколько кластеров поверхностно расположенных аминокислотных остатков, характерных для доменов этой группы. Примечательно, что два этих кластера совпадают с сайтами функциональных TIR-TIR взаимодействий. Большой из них образован участком последовательности между третьим и четвёртым β -тяжами (Рис. 69а–в). Четыре центрально расположенные позиции этого кластера, а именно -71W₉-х-х-Y₉-х(3)-Q₉-х(3)-E₈-, формируют характерный для адаптера TIRAP участок поверхности TIR домена (Рис. 69а, в).

Второй кластер, характерный для этой группы TIR доменов, располагается между четвёртым и пятым β -тяжами и имеет типичную последовательность -Y₉P₉-х-E₉L₉R₈-х-х-Y₈- (Рис. 69а, б, г, д). Этот кластер выделен синим цветом в панелях а и б рисунка 69, и в его центре располагается короткая 3_{10} -спираль D (Рис. 69г). Блокирующие пептиды, включающие в себя эти мотивы, ингибировали экспрессию и продукцию цитокинов, стимулированную LPS (Рис 29, 30) (Couture et al., 2012). Также было показано, что участки поверхности TIR доменов, соответствующие этим мотивам, осуществляют междоменные взаимодействия в филаментозных, мультимерных комплексах, самособирающихся из рекомбинантных TIR доменов TIRAP в растворе (Рис. 69д, (Ve et al., 2017)). Наши исследования свойств блокирующих пептидов показали, что позиции интерфейсов, осуществляющих гетеротипические взаимодействия TIRAP с TIR доменами MyD88 и различных TLR, сходны с позициями гомотипических взаимодействий TIR доменов в филаментах TIRAP (Toshchakov & Javmen, 2020).

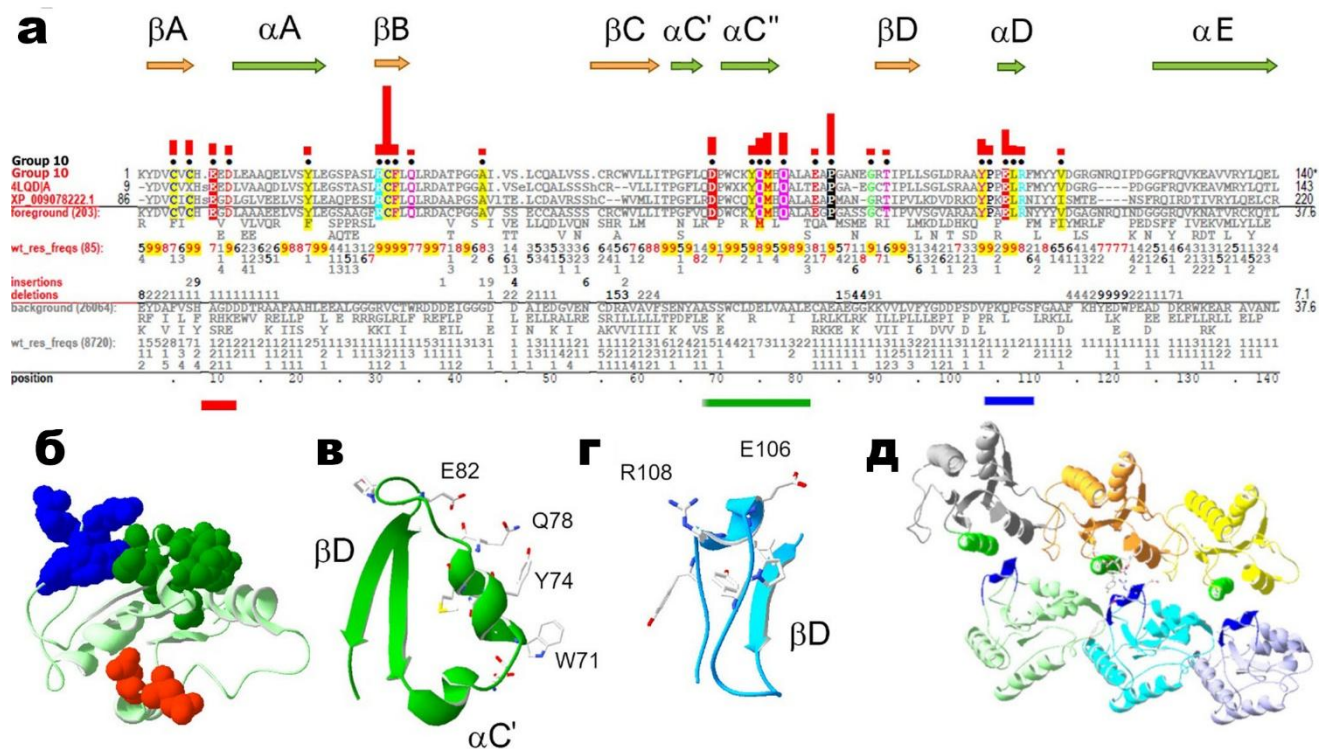


Рисунок 69 — Мотивы аминокислотной последовательности, характерные для TIR доменов адаптера TIRAP (Toshchakov and Neuwald 2020)

а – контрастное выравнивание последовательностей TIR доменов группы 10, включающей в себя TIR домены адаптера TIRAP, сформировано аналогично контрастным выравниваниям, представленным выше на рисунках 65–68. Горизонтальные прямоугольники под последовательностями показывают кластеры аминокислотных остатков, образующие характерные для данного класса элементы структуры, также показанные в соответствующих цветах в панели 69б.

б – структура TIR домена адаптера TIRAP человека – представителя группы 23 (PDB ID: UZB) (Ve et al., 2017). 3 кластера специфичных для группы 10 аминокислотных остатков выделены зелёным, синим и красным цветами. Аминокислотные остатки, образующие 3 кластера, показаны и в панели 69а (подчеркнуты горизонтальными прямоугольниками соответствующего цвета). Боковые цепи показаны только для аминокислотных остатков, принадлежащих к трём кластерам мотива, общего для TIR доменов TIRAP.

в – расположенный в районе третьего спирального участка аминокислотный кластер, характерный для TIR доменов группы 10, имеет последовательность -W₉C₉-x-Y₉Q₈M₉-x-Q₉A₈L₉-x-E₈- (подчёркиванием выделены аминокислотные остатки, боковые

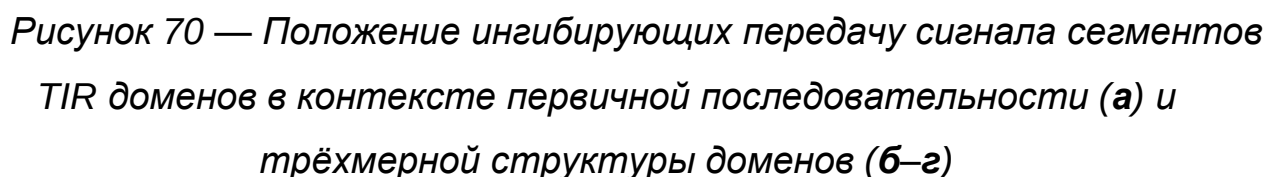
цепи которых располагаются на поверхности домена и образуют характерный для группы участок поверхности домена). Этот мотив представляет TIRAP-специфичный вариант сайта 2 функциональных TIR–TIR взаимодействий, который также показан (выделен зелёным прямоугольником внизу выравнивания) в панели **а**.

г – характерный для TIR доменов белков TIRAP кластер аминокислотных остатков, расположенных между β -тяжами С и D. Этот кластер представляет TIRAP-специфичный вариант сайта 3 функциональных TIR–TIR взаимодействий (Toshchakov & Javmen, 2020) (Табл. 3). Аминокислотные остатки, формирующие этот кластер, выделены прямоугольником синего цвета в панели **а** рисунка 69.

д – в числе прочих взаимодействий, TIR домены адаптера TIRAP в составе сигнал-активирующего протофиламента связывают друг друга за счёт взаимодействий сайтов 2 и 3, показанных выше в панелях **в** и **г**. Изображение представляет двуцепочечный фрагмент сигналосомы, составленный из 6-ти TIR доменов TIRAP (PDB ID: UZB) (Ve et al., 2017). Взаимодействующие между собой α -спирали С'' и D отдельных TIR доменов (сайты 2 и 3 соответственно) выделены зелёным и синим цветами.

4.6 Комплексный анализ результатов скрининга пептидных библиотек, представляющих сайты сигнал-зависимых взаимодействий TIR доменов

Рисунок 70 (панель **а**) показывает выравнивание последовательностей TIR доменов, использовавшихся при дизайне пептидных библиотек, проскринированных в ходе наших исследований. Участки последовательностей, представленные отдельными пептидами (регионы 1–12), показаны в различных цветах. В чёрном цвете показаны не включённые в скрининг С-концевые участки, или же не представленные на поверхности доменов аминокислотные остатки, которые образуют сердцевину доменов (Рис. 70а). Участки последовательностей, представленные пептидами, проявившими выраженные ингибиторные свойства, выделены подчёркиваниями (Рис. 70а). Анализ положения проявляющих ингибиторные свойства участков в контексте трёхмерной



а – выравнивание последовательностей TIR доменов, использовавшихся при дизайне пептидных библиотек. Участки, представляющие отдельные пептиды (регионы 1–11), выделены различными цветами. Участки последовательностей, проявляющие выраженные ингибиторные свойства в составе БП, подчеркнуты. Аминокислотные остатки, выделенные чёрным, не были включены в состав пептидов при первичном скрининге, поскольку они образуют сердцевину домена и не экспонированы на поверхности. Элементы вторичной структуры TIR доменов последовательно обозначены заглавными буквами английского алфавита, начиная с N-конца, следующим образом: спирали — αA – αE ; тяжи — βA – βE ; петли обозначены двумя заглавными буквами, например, BB — это петля, соединяющая второй тяж со второй спиралью.

б – четыре сайта, осуществляющих взаимодействия TIR доменов в ходе сборки сигнальных комплексов при активации TLR. Сайт 1 образован петлями AB и BB, вместе с коротким тяжом βB . Этот сайт также может включать прилегающий к TIR домену сегмент участка, соединяющего TIR и трансмембранный домен некоторых TLR. Сайт 2 образован αC , но может включать и располагающуюся рядом спираль αB . Сайт 3 сформирован спиралью D вместе с прилегающими сегментами петель DD и DE. Сайт 4 располагается в районе краевого тяжа βE , формирующего поверхность, расположенную приблизительно противоположно тяжу βB (и сайту 1). Этот сайт, помимо тяжа βE , включает петлю EE и спираль αE .

в – сайты 1 и 4 взаимодействуют друг с другом, образуя внутрифиламентные связи в составе мультифиламентного комплекса, спонтанно образуемого TIR доменами адаптера TIRAP. Реципрокные взаимодействия сайтов 2 и 3 осуществляют межфиламентные взаимодействия. Изображение представляет двуцепочечный фрагмент сигнасомы, состоящий из 6-ти TIR доменов TIRAP (PDB ID: 5UZZ) (Ve et al., 2017). Взаимодействующие сегменты показаны в цветах, соответствующих панели **б**.

г – схематическое представление взаимодействия сайтов 1–4 при сборке сигнасомы при активации TLR.

Сайт 1 включает в себя β -тяж B и прилегающие к нему петли AB и BB. Петля BB исторически была первым идентифицированным сайтом, осуществляющим функциональные TIR-TIR взаимодействия. Идентификация основывалась на том, что мутация, ответственная за

нечувствительность мышей линии C3H/HeJ к летальным дозам LPS, располагается в этой петле (Poltorak et al., 1998; Xu et al., 2000). Функциональность этого сайта также подтверждалась эволюционной сохранностью локальной последовательности участка, а также наблюдением, показывающим, что пептид, происходящий из петли BB адаптерного белка TIRAP, умеренно ингибировал передачу сигнала TLR4 (Horng et al., 2001). Наши скрининги подтвердили высокую ингибиторную активность пептидов, происходящих из петли BB TIR доменов TRAM, MyD88, TRIF и TLR4. Вместе с тем, отмечалась сравнительно низкая ингибиторная активность BB петли адаптера TIRAP, а также многих TLR (Рис. 70а). Также, во многих случаях отмечалась высокая ингибиторная активность пептидов, происходящих из петли AB – участка, располагающегося рядом с петлёй BB и формирующего общую с ним поверхность. Высокая ингибиторная активность пептидов петли AB отмечалась для TIR доменов TLR2, TLR4 и TIRAP (Рис. 70а), тогда как в случае TLR9 наиболее выраженная ингибиторная активность отмечалась у пептида 9R34, включающего в себя β -тяж В целиком, а также С-концевую половину петли AB и N-концевую часть петли BB (Javmen et al., 2018) (Рис. 70а). К сайту 1 был отнесён и участок, соединяющий структурированную часть TIR домена с трансмембранным участком TLR, поскольку пептиды, ему соответствующие, ингибировали передачу сигнала TLR4, TLR2 и TLR7. Этот участок (обозначен на схеме как Region 1) стерически может создавать одну поверхность с петлями AB и BB (Toshchakov et al., 2011).

Сайт 2 по большей части образован α -спиральным участком, располагающимся между β -тяжами С и D и обозначенным как регион 6 на выравнивании рисунка 70а. Пептиды, соответствующие этому участку TIR доменов адаптеров TIRAP и TRAM, ингибировали LPS-индуцированную продукцию цитокинов и активацию МАПК. Выраженной ингибиторной активностью обладали и пептиды региона 6 рецепторов TLR7 и TLR9, тогда как в библиотеке TIR домена TLR5 наибольшей активностью обладал

пептид 5R667. Также к сайту 2 был отнесён и сегмент последовательности, формирующий спираль α B. Спирали α B и α C располагаются рядом друг с другом, прилегая к выпуклой стороне β -листа, и образуют общую поверхность (Рис. 70б). Включение спирали α B в сайт 2 основывается на ингибиторных свойствах, проявляемых пептидами, происходящими из этого участка адаптеров TRIF и TIRAP (Рис. 70а).

Следующим участком последовательности TIR доменов, продуцирующим ингибиторные пептиды с высокой частотой, является участок, центр которого располагается в районе α -спирали D (Рис. 70а). Этот участок формирует сайт 3 TIR-TIR взаимодействий (Рис. 70). Пептиды, происходящие из этого участка рецепторов TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR9 и адаптера TIRAP, оказывали выраженное ингибиторное действие на передачу сигнала соответствующими рецепторами (Рис. 70а).

Последний сайт TIR-TIR взаимодействий (сайт 4, Рис. 70) располагается в районе β -тяжа E и включает прилегающие к β E спираль α E и петлю EE. Этот сайт образует поверхность, расположенную на стороне, противоположной сайту 1 (Рис. 70б, в). Сайты 1 и 4 взаимодействуют в структуре комплексов, спонтанно образуемых TIR доменами адаптеров TIRAP и MyD88, осуществляя внутрифиламентные контакты TIR доменов (Рис. 70в) (Clabbers et al., 2021; Ve et al., 2017). Ингибиторные свойства в отношении передачи сигнала активированными TLR были подтверждены для пептидов, происходящих из сайта 4 рецепторов TLR1, TLR4, TLR5, TLR7 и TLR9, а также адаптера TIRAP (Рис. 70а). Ингибиторные пептиды, происходящие из сайта 4, демонстрировали мультиспецифический характер связывания, будучи способными связывать TIR домены как рецепторов, так и адаптеров (Табл. 3). Такой характер взаимодействия согласуется с текущими моделями взаимодействия TIR доменов в иницирующем сигнальном комплексе, поскольку одни и те же сайты

осуществляют как димеризацию TIR доменов рецепторов, так и рекрутирование адаптеров (Рис. 70г).

Сайты 2 и 3 также взаимодействуют реципрокно, осуществляя межфиламентные взаимодействия в структуре мультифиламентных комплексов самособирающихся из рекомбинантных TIR доменов адаптеров TIRAP и MyD88 (Рис. 70в) (Clabbers et al., 2021; Ve et al., 2017). Примечательно, что все 5 ингибиторных пептида, происходящие из сайта 3 TIR доменов рецепторов (пептиды 1R9, 2R9, 4R9, 6R9 и 7R9), преимущественно связывали адаптерные TIR домены (Табл. 3), подтверждая предложенные модели рекрутирования адаптеров посредством взаимодействия с непосредственным участием сайта 3 рецепторов (Clabbers et al., 2021; Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020; Ve et al., 2017) (Рис. 70г).

Выполненные нами скрининги пептидных библиотек, представляющих вероятные сайты взаимодействия сигнальных белков, убедительно показали эффективность данного подхода как для изучения фундаментальных механизмов распознавания белков при передаче сигнала Толл-подобными рецепторами в клетке, так и для решения более прикладных задач разработки ингибиторов сигнальных путей. Локализация сегментов последовательности, проявляющих ингибиторные свойства в составе БП, в целом согласуется и уточняет двуцепочечную модель сигнального комплекса, образуемого TIR доменами TLR и их адаптеров при активации (Clabbers et al., 2021; Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020; Ve et al., 2017).

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методология блокирующих передачу сигнала пептидов как элемент комплексного анализа молекулярных механизмов функционирования сигнальных путей

В представленной к защите работе был предложен, разработан и опробован комплекс методических подходов для изучения взаимодействий сигнальных белков, инициирующих передачу сигнала при активации клеточных рецепторов. Первичными в предложенном комплексе являются методы клеточной и экспериментальной биологии, что отличает его от более традиционных подходов, использующих биохимические и структурно-биологические методы. Ключевое отличие подхода заключается в том, что он не требует от исследователя субъективного выбора объекта для изучения, его последующей очистки или получения рекомбинантного аналога природного белка. В основе предложенного нами комплекса методов лежит скрининг пептидных библиотек, представляющих вероятные сайты связывания доменов взаимодействия белков (ДВБ), часто присутствующих в рецепторах и адаптерных белках, рекрутируемых к рецепторам при активации. Дизайн пептидных библиотек осуществлялся таким образом, что все пептиды библиотеки в совокупности полно представляли поверхность исследуемого ДВБ, но исключали не экспонированные на поверхности доменов участки, образующие сердцевину доменов. Каждый пептид библиотеки снабжался пептидным вектором, обеспечивающим внутриклеточное проникновение, и библиотеки скринировались на культивируемых клетках в функциональных тестах по способности блокировать функциональные проявления активации рецептора. Связывание способных блокировать передачу сигнала пептидов с потенциальными белками-мишенями изучали при помощи специально разработанной системы, позволяющей количественно оценивать связывание ингибиторных пептидов с ДВБ рецепторов и

адаптерных белков непосредственно в клетках. Также, кинетика и сродство ингибиторных пептидов с идентифицированными мишенями изучались в тестах *in vitro* с использованием рекомбинантного ДВБ. Функциональность ингибиторных пептидов была верифицирована в экспериментах на мышах как по способности подавлять системный цитокиновый ответ, индуцированный введением нелетальной дозы агонистов TLR, так и по способности предотвращать смертность вследствие введения летальной дозы LPS или вирусного патогена. Молекулярно-биологические методы анализа взаимодействия сигнальных белков с помощью пептидных библиотек были дополнены биоинформатическим анализом эволюционной вариабельности последовательностей TIR доменов, что позволило более точно интерпретировать результаты практической экспериментальной работы.

Результаты скринингов пептидных библиотек убедительно продемонстрировали информативность данного подхода при анализе белок-белковых взаимодействий в процессе функционирования сигнальных путей. Способность метода корректно идентифицировать сайты TIR-TIR взаимодействий наиболее убедительно показывается соответствием позиций ингибиторных пептидов в трёхмерной структуре TIR доменов с данными структурно-биологической идентификации TIR-TIR интерфейсов в спонтанно образующихся комплексах TIR доменов. Подробно это соответствие обсуждалось в наших публикациях (Javmen et al., 2018; Toshchakov & Javmen, 2020; Toshchakov, 2024), а также выше, в разделах 4.3.7 и 4.6 настоящего диссертационного исследования. Помимо топологического соответствия результатов идентификации сайтов белковых взаимодействий методами пептидного скрининга и структурной биологии, утилитарность данного подхода показывается высокой частотой идентификации ингибиторов передачи сигнала при скрининге библиотек. Так, скрининги библиотек, представляющих TIR домен адаптера TIRAP, а также рецепторов TLR4, TLR7 и TLR9, выявили до 5 пептидов,

ингибирующих функциональные проявления активации соответствующих рецепторов ((Couture et al., 2012; Javmen et al., 2018, 2020; Toshchakov et al., 2011; Toshchakov & Javmen, 2020), причём все идентифицированные пептиды могут быть ассоциированы с предсказанными сайтами TIR-TIR взаимодействий в иницирующем сигнальном комплексе (Табл. 3). Вместе с тем, результаты скрининга библиотек показали, что значительная часть пептидов, соответствующих сайту связывания, может и не проявлять ингибирующей активности в тестах на культуре клеток или *in vivo*. Наиболее частыми причинами отсутствия функциональной активности в таких случаях оказываются такие факторы, как неспецифическое связывание пептида компонентами протеома клетки, недостаточная растворимость пептида, негативное влияние мишень-связывающей части на проницаемость пептида, биологическая нестабильность пептида и другие факторы (Toshchakov, 2024).

Ещё одним свидетельством, подтверждающим, что связывание TIR доменов ингибиторными пептидами действительно является механизмом ингибирования передачи сигнала в соответствующем сигнальном пути, стало практически полное совпадение кажущихся констант связывания пар белок–БП, измеренных в клеточной системе, с константами ингибирования функции TLR, также измеренными в клеточной системе (Javmen et al., 2018, 2020, 2023; Piao et al., 2015). Многочисленные примеры, подробно разобранные в опубликованных нами ранее обзорах литературы (Toshchakov & Javmen, 2020; Toshchakov, 2024), продемонстрировали практически полное совпадение эффективных концентраций, необходимых для блокирования передачи сигнала проникающими БП и для тушения ими флуоресценции экспрессируемых в клетках меченых TIR доменов. Важно отметить, что константы ингибирования пептидами передачи сигнала, измеренные в функциональных тестах в культуре клеток, как и константы связывания пептидов с мишенями, измеренными по тушению флуоресценции непосредственно в клетках, оказались значительно выше

констант связывания пептида с рекомбинантной мишенью. Это расхождение объяснялось неспецифическим связыванием пептидов с протеомом клетки, а также с неоднородностью концентраций проникающих БП в клеточных системах. Кроме того, это расхождение убедительно демонстрирует преимущество скрининга потенциальных ингибиторов сигнальных путей в клеточной модели (как по ингибированию передачи сигнала, так и по связыванию с эктопически экспрессируемой мишенью) в сравнении со скринингом ингибиторов по связыванию с рекомбинантно продуцируемыми белковыми мишенями в тестах *in vitro*.

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 их ингибиторного действия в экспериментах *in vivo* и биоинформатическим анализом, позволил корректно 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 прочную 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 TLRs 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 B, C и D.
3. Бинарные взаимодействия TIR доменов характеризуются значительной мультиспецифичностью, но не являются универсальными. Различные TIR домены демонстрируют различную степень перекрёстной реактивности, что обеспечивает как специфичность, так и гибкость в формировании сигнальных комплексов.
4. Пептиды, соответствующие первичным последовательностям, формирующим сайт связывания TIR домена или его бóльшую часть, эффективно блокируют передачу сигнала с соответствующих TLR *in vitro* и *in vivo*.
5. Идентифицированные блокирующие пептиды представляют собой перспективную платформу для разработки новых противовоспалительных препаратов, способных избирательно подавлять TLR-специфические сигнальные пути без полного исключения иммунной системы.

Таблица 1. Последовательности исследованных пептидов и представляемые ими структурные элементы TIR доменов.

№	Наименование пептида	Белок-прототип	Аминокислотная последовательность	Представляемый структурный элемент TIR домена
1	4R1	TLR4	RQIKIWFQNRRMKWKKAGCKKYSRGESIYD	N-концевой сегмент
2	4R2	TLR4	RQIKIWFQNRRMKWKKSQNEDWVRNELVKV	петля AA, α -спираль A
3	4R3	TLR4	RQIKIWFQNRRMKWKKKEEGVPRFHL	петля AB, β -тяж B
4	4BB	TLR4	RQIKIWFQNRRMKWKKLHYRDFIPGVAIAA	петля BB, α -спираль B
5	4R5	TLR4	RQIKIWFQNRRMKWKKNIIEGFGHKSARKV	α -спираль B, петля BC
6	4R6	TLR4	RQIKIWFQNRRMKWKKRHFISRWCFEYE	петля CC, α -спираль C
7	4R7	TLR4	RQIKIWFQNRRMKWKKIAQTWQFLSSRSI	петля CD
8	4R8	TLR4	RQIKIWFQNRRMKWKKVLEKVEKSL	петля DD
9	4R9	TLR4	RQIKIWFQNRRMKWKKLRQQVELYRLLSR	α -спираль D
10	4 β E	TLR4	RQIKIWFQNRRMKWKKNTYLEWEDNPLGR	петли DE, EE, β -тяж E
11	4 α E	TLR4	RQIKIWFQNRRMKWKKHIFWRRLKNALLD	α -спираль E
12	4R12	TLR4	RQIKIWFQNRRMKWKKASNPETAEETQET	C-концевой сегмент
13	CP	контрольный пептид	RQIKIWFQNRRMKWKKSLHGRGDPMEAFII	случайная последовательность
14	2R1	TLR2	RQIKIWFQNRRMKWKKRKPCKAPCRDVCYD	N-концевой сегмент
15	2R2	TLR2	RQIKIWFQNRRMKWKKEQDSHWVENMVQQ	α -спираль A
16	2R3	TLR2	RQIKIWFQNRRMKWKKENSDDPPFKLC	петля AB, β -тяж B
17	2R34	TLR2	RQIKIWFQNRRMKWKKPPFKLCLEHGRDF	β -тяж B, петля BB
18	2R4	TLR2	RQIKIWFQNRRMKWKKHGRDFVPGKWIID	петля BB, α -спираль B
19	2BB	TLR2	RQIKIWFQNRRMKWKKLHGRDFVPGKWIID	петля BB, α -спираль B
20	2R5	TLR2	RQIKIWFQNRRMKWKKNIIDSIEKSHKT	α -спираль B
21	2R6	TLR2	RQIKIWFQNRRMKWKKENFVRSEWCKYELD	α -спираль C
22	2R7	TLR2	RQIKIWFQNRRMKWKKFSHFRLFDENNDAA	петля CD

23	2R8	TLR2	RQIKIWFQNRRMKWKKLLEPIERKAI	β-тяж D, петля DD
24	2R9	TLR2	RQIKIWFQNRRMKWKKPQRFCCLKRKIMNT	петля DD, α-спираль D
25	2R10	TLR2	RQIKIWFQNRRMKWKKTYLEWPLDEGQQ	петля EE, β-тяж E
26	2R11	TLR2	RQIKIWFQNRRMKWKKKEVFWVNLRTAICS	α-спираль E
27	16R1	TLR1, TLR6	RQIKIWFQNRRMKWKKHIPLEELQRNLQFH	N-концевой сегмент
28	1R2	TLR1	RQIKIWFQNRRMKWKKGHDSAWVKNELLPN	α-спираль A
29	6R2	TLR6	RQIKIWFQNRRMKWKKEHDSAWVKNELLPN	α-спираль A
30	1R3	TLR1	RQIKIWFQNRRMKWKKKEKDDIQIC	петля AB
31	6R3	TLR6	RQIKIWFQNRRMKWKKKEKDDIRVC	петля AB
32	16R4	TLR1, TLR6	RQIKIWFQNRRMKWKKLHERNFVPGKSIVE	петля BB
33	1R5	TLR1	RQIKIWFQNRRMKWKKNIINFIEKSYKS	α-спираль B
34	6R5	TLR6	RQIKIWFQNRRMKWKKNIINFIEKSYKA	α-спираль B
35	16R6	TLR1, TLR6	RQIKIWFQNRRMKWKKPHFIQSEWCHYEYLY	α-спираль C
36	16R7	TLR1, TLR6	RQIKIWFQNRRMKWKKFAHHNLFHEGSDNL	петля CD
37	1R8	TLR1	RQIKIWFQNRRMKWKKLLAPIPQYSI	петля DD
38	6R8	TLR6	RQIKIWFQNRRMKWKKLLEPILQNNI	петля DD
39	1R9	TLR1	RQIKIWFQNRRMKWKKPTNYHKLKTLMSR	α-спираль D
40	6R9	TLR6	RQIKIWFQNRRMKWKKPSRYHKLRLMAQ	α-спираль D
41	1R10	TLR1	RQIKIWFQNRRMKWKKRITYLEWPTEKNKH	петли DE, EE, β-тяж E
42	6R10	TLR6	RQIKIWFQNRRMKWKKRITYLEWPTEKGKR	петли DE, EE, β-тяж E
43	16R10	TLR1, TLR6	RQIKIWFQNRRMKWKKRITYLEWPTEK	петля DE, β-тяж E
44	1R1011	TLR1	RQIKIWFQNRRMKWKKKHGLFWANLRAS	петля EE, α-спираль E
45	6R1011	TLR6	RQIKIWFQNRRMKWKKGKRGFWANLRAS	петля EE, α-спираль E
46	1R11	TLR1	RQIKIWFQNRRMKWKKGLFWANLRASINV	α-спираль E

47	6R11	TLR6	RQIKIWFQNRRMKWKKGLFWANLRASFIM	α -спираль E
48	9R1	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKGRQSGRDEDALPYD	N-концевой сегмент
49	9R2	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKDKTQSAVADWVYNE	петля AA, α -спираль A
50	9R3	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKRGQLEECRGRWALR	α -спираль A, петля AB
51	9R34	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKGRWALRLCLEERD	петля AB, β -тяж B, петля BB
52	9R34- Δ N	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKALRLCLEERD	петля AB, β -тяж B, петля BB
53	9R34- Δ C	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKGRWALRLCLE	петля AB, β -тяж B
54	9R34-C/S	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKGRWALRLSLEERD	петля AB, β -тяж B, петля BB
55	9R34- Δ L1	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKGRWALRACLEERD	петля AB, β -тяж B, петля BB
56	9R34- Δ L2	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKGRWALRACAEERD	петля AB, β -тяж B, петля BB
57	9R4	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKLEERDWLPGKTLFE	петля BB
58	9R5	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKNLWASVYGSRKT	α -спираль B, петля BC
59	9R6	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKHTDRVSGLLRASFL	α -спираль C
60	9R7	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKLAQQRLLEDKRD	α -спираль C, петля CD
61	9R8	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKSPDGRRSRYVR	петля DD, α -спираль D
62	9R9	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKRYVRLRQRLCRQS	α -спираль D, петля DE
63	9R10	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKQSVLLWPHQPSGQ	петля DE, β -тяж E, петля EE
64	9R11	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKRSFWAQLGMALTRD	α -спираль E
65	9R12	TLR9	RQIKIWFQNRRMKWKKNHFFYNRNFQCQGT	C-концевой сегмент
66	7R1	TLR7	RQIKIWFQNRRMKWKKGYQRLISPDCYD	N-концевой сегмент
67	7R2	TLR7	RQIKIWFQNRRMKWKKDKTDPVTEWVLAE	петля AA, α -спираль A
68	7R3	TLR7	RQIKIWFQNRRMKWKKVAKLEDPREKHFNL	α -спираль A, петля AB, β -тяж B
69	7R34	TLR7	RQIKIWFQNRRMKWKKEDPREKHFNLCLEER	петля AB, β -тяж B, петля BB
70	7R4	TLR7	RQIKIWFQNRRMKWKKLEERDWLPGQPVLE	петля BB

71	7R5	TLR7	RQIKIWFQNRRMKWKKNLSSQSIQLSKKT	α -спираль B
72	7R6	TLR7	RQIKIWFQNRRMKWKKDKYAKTENFKIAFY	α -спираль C, петля CD
73	7R7	TLR7	RQIKIWFQNRRMKWKKLSHQRLMDEKVDV	петля CD
74	7R8	TLR7	RQIKIWFQNRRMKWKKKEKPFQKSKF	петля DD
75	7R9	TLR7	RQIKIWFQNRRMKWKKFLQLRKRLCGSS	петля DD, α -спираль D, петля DE
76	7R10	TLR7	RQIKIWFQNRRMKWKKVLEWPTNPQAH	β -тяж E, петля EE
77	7R11	TLR7	RQIKIWFQNRRMKWKKPYFWQCLKNALATD	α -спираль E
78	7R11- Δ N	TLR7	RQIKIWFQNRRMKWKKQCLKNALATD	α -спираль E
79	7R11- Δ C	TLR7	RQIKIWFQNRRMKWKKPYFWQCLKNA	α -спираль E
80	7R11-C/S	TLR7	RQIKIWFQNRRMKWKKPYFWQSLKNALATD	α -спираль E
81	7R12	TLR7	RQIKIWFQNRRMKWKKNHVAYSQVFKETV	C-концевой участок
82	5R1	TLR5	RQIKIWFQNRRMKWKKDHPQGTEPDMYKYD	N-концевой сегмент
83	5R2	TLR5	RQIKIWFQNRRMKWKKSKDFTWVQNALLKH	петля AA, α -спираль A
84	5R3	TLR5	RQIKIWFQNRRMKWKKDTQYSDQNRFNLC	α -спираль A, петля AB
85	5R34- Δ N	TLR5	RQIKIWFQNRRMKWKKRFNLCFEERD	петля AB, β -тяж B, петля BB
86	5R4	TLR5	RQIKIWFQNRRMKWKKFEERDFVPGENRIA	β -тяж B, петля BB, α -спираль B
87	5R5	TLR5	RQIKIWFQNRRMKWKKNIQDAIWNRSRKI	α -спираль B, петля BC
88	5R6	TLR5	RQIKIWFQNRRMKWKKRHFLRDGWCLEAFS	α -спирали C
89	5R67	TLR5	RQIKIWFQNRRMKWKKCLEAFSYAQGRSL	α -спираль C''
90	5R667	TLR5	RQIKIWFQNRRMKWKKWCLEAFSYAQGR	α -спираль C''
91	5R7	TLR5	RQIKIWFQNRRMKWKKYAQGRCLSDLNSA	α -спирали C, петля CD, β -тяж D
92	5R8	TLR5	RQIKIWFQNRRMKWKKGSLSQYQLMKH	петля DD, α -спираль D
93	5R89	TLR5	RQIKIWFQNRRMKWKKLMKHQSIRGFVQK	петля DD, α -спираль D, петля DE
94	5R9	TLR5	RQIKIWFQNRRMKWKKHQSIRGFVQKQQ	α -спираль D, петля DE

95	5R10	TLR5	RQIKIWFQNRRMKWKKQQLRWPEDLQDV	петля DE, β -тяж E, петля EE
96	5R1011	TLR5	RQIKIWFQNRRMKWKKEDLQDVGWFLHKLS	петля EE, α -спираль E
97	5R11	TLR5	RQIKIWFQNRRMKWKKGWFLHKLSQQILKK	α -спираль E
98	5R12	TLR5	RQIKIWFQNRRMKWKKKEKEKKDNNIPLQT	C-концевой участок
99	Antp	Antennapedia homeodomain	RQIKIWFQNRRMKWKK	проникающий в клетки вектор, α -спираль
100	TR1	TIRAP	RQIKIWFQNRRMKWKKSSSSSSGRWSKDYD	N-концевой сегмент
101	TR2	TIRAP	RQIKIWFQNRRMKWKKSEEDLEAAQELVSY	петля AA, α -спираль A
102	TR3	TIRAP	RQIKIWFQNRRMKWKKEGSQASLRCF	α -спираль A, петля AB
103	TR4	TIRAP	RQIKIWFQNRRMKWKKQLRDAAPGGAIVS	β -тяж B, петля BB
104	TR5	TIRAP	RQIKIWFQNRRMKWKKELCQALSRSHCR	α -спираль B, петля BC
105	TR6	TIRAP	RQIKIWFQNRRMKWKKPGFLRDPWCKYQML	петля CC, α -спирали C
106	TR7	TIRAP	RQIKIWFQNRRMKWKKQALTEAPASEGCT	α -спирали C, петля CD
107	TR8	TIRAP	RQIKIWFQNRRMKWKKLSGLSRAAYPPE	петля DD
108	TR9	TIRAP	RQIKIWFQNRRMKWKKAAYPPELRFMYVD	петля DD, α -спираль D, петля DE
109	TR10	TIRAP	RQIKIWFQNRRMKWKKYYVDGRGKD	β -тяж E, петля EE
110	TR11	TIRAP	RQIKIWFQNRRMKWKKGGFYQVKEAVIHY	α -спираль E
111	TR45	TIRAP	RQIKIWFQNRRMKWKKGAIVSELQALSR	петля BB, α -спираль B
112	TR9-s	TIRAP	RQIKIWFQNRRMKWKKPPELRFMY	α -спираль D, петля DE
113	TM1	TRAM	RQIKIWFQNRRMKWKKGAGAEQDEEEFLK	N-концевой сегмент
114	TM2	TRAM	RQIKIWFQNRRMKWKKAEDDTDEALRVQDL	петля AA, α -спираль A
115	TM3	TRAM	RQIKIWFQNRRMKWKKQNDFGIRPG	петля AB
116	TM4	TRAM	RQIKIWFQNRRMKWKKIVFAEMPCGRHLHQ	петля BB
117	TM4-E/A	TRAM	RQIKIWFQNRRMKWKKIVFAAMPCGRHLHQ	петля BB
118	TM4-P/H	TRAM	RQIKIWFQNRRMKWKKIVFAEMHCGRHLHQ	петля BB

119	TM4-C/H	TRAM	RQIKIWFQNRMRMKWKIVFAEMPHGRHLHQ	петля BB
120	TM4-N	TRAM	RQIKIWFQNRMRMKWKIVFAE	петля BB
121	TM4-M	TRAM	RQIKIWFQNRMRMKWKKEPCG	петля BB
122	TM4-C	TRAM	RQIKIWFQNRMRMKWKRHLHQ	петля BB
123	TM4-ΔN	TRAM	RQIKIWFQNRMRMKWKMPGRLHLHQ	петля BB
124	TM4-ΔM	TRAM	RQIKIWFQNRMRMKWKIVFARHLHQ	петля BB
125	TM4-ΔC	TRAM	RQIKIWFQNRMRMKWKIVFAEMPCG	петля BB
126	TM5	TRAM	RQIKIWFQNRMRMKWKNLDDAVNGSAWT	α-спираль B, петля BC
127	TM6	TRAM	RQIKIWFQNRMRMKWKENFLRDTWCNFQFY	α-спирали C
128	TM7	TRAM	RQIKIWFQNRMRMKWKTSLMNSVSRQHKYNS	α-спирали C, петля CD
129	TM8	TRAM	RQIKIWFQNRMRMKWKRPLNSPLPRE	петля DD
130	TM8/9	TRAM	RQIKIWFQNRMRMKWKPRERTPLALQTINA	петля DD, α-спираль D, петля DE
131	TM9	TRAM	RQIKIWFQNRMRMKWKRTPLALQTINA	петля DD, α-спираль D, петля DE
132	TM9/10	TRAM	RQIKIWFQNRMRMKWKQTINALEEES	петля DE
133	TM10	TRAM	RQIKIWFQNRMRMKWKLEEESQGFSTQVE	петля DE, петля EE, α-спираль E
134	TM11	TRAM	RQIKIWFQNRMRMKWKKRIFRESVFERQQS	α-спираль E
135	TF1	TRIF	RQIKIWFQNRMRMKWKKVLDSHSETSDQKFYN	N-концевой сегмент
136	TF2	TRIF	RQIKIWFQNRMRMKWKKARADEQVARIREK	петля AA, α-спираль A
137	TF3	TRIF	RQIKIWFQNRMRMKWKETLGVPDGAT	α-спираль A, петля AB, β-тяж B
138	TF4	TRIF	RQIKIWFQNRMRMKWKKCEEQVPGRGELH	петля BB, α-спираль B
139	TF45	TRIF	RQIKIWFQNRMRMKWKKGRGELHCLQDA	α-спираль B
140	TF5	TRIF	RQIKIWFQNRMRMKWKCLQDAIDHSGFT	α-спираль B, петля BC
141	TF5-ΔC	TRIF	RQIKIWFQNRMRMKWKCLQDAIDHS	α-спираль B
142	hTF5	TRIF	RQIKIWFQNRMRMKWKCLQDAIDHSAFI	α-спираль B, петля BC

143	TF6	TRIF	RQIKIWFQNRRMKWKKASFDCSLSLHQINH	петля CC, α -спирали C
144	TF7	TRIF	RQIKIWFQNRRMKWKKALMNSLTQSGRQDC	петля CD, β -тяж D
145	TF8	TRIF	RQIKIWFQNRRMKWKKLPLECSQAQL	петля DD
146	TF9	TRIF	RQIKIWFQNRRMKWKKSPDTTRLHLSIVW	петля DD, α -спираль D
147	TF10	TRIF	RQIKIWFQNRRMKWKKLDEHSPIFARKVA	петля EE, α -спираль E
148	TF11	TRIF	RQIKIWFQNRRMKWKKNTFKTQKLQAQRV	α -спираль E
149	mMyD88-BB	MyD88	RQIKIWFQNRRMKWKKVSDRDVLPGTCVWS	петля BB
150	mMyD88-R6	MyD88	RQIKIWFQNRRMKWKKDDYLSKECDFQTK	α -спирали C
151	TM6 wo Antp	TRAM	ENFLRDTWCNFQFY	α -спирали C

Таблица 2. Влияние конъюгированных с Cy3 пептидов 5R667 и TR667 на взвешенное по амплитуде среднее время затухания флуоресценции (amplitude-weighted average fluorescence lifetime (A-WALF)) свободного Cer и Cer слитого с TIR доменом TLR5, TIRAP или MyD88 (Javmen et al., 2023).

Донор	A-WAFL [нс] (в отсутствие акцептора)	Акцептор	A-WAFL [нс] (в присутствии акцептора)		
			Концентрация акцептора [мкМ]		
			2.5	10	40
TLR5-Cer	1.88 ± 0.08	Cy3-5R667	1.86 ± 0.16	1.73 ± 0.11	1.43 ± 0.33
		Cy3-TR667	1.80 ± 0.10	1.76 ± 0.16	1.51 ± 0.31
TIRAP-Cer	2.03 ± 0.08	Cy3-5R667	1.85 ± 0.27	1.72 ± 0.37	1.27 ± 0.30
		Cy3-TR667	1.87 ± 0.27	1.64 ± 0.35	1.38 ± 0.50
		Cy3-2R9	1.83 ± 0.26	1.54 ± 0.26	0.64 ± 0.19
MyD88-Cer	1.96 ± 0.16	Cy3-5R667	1.94 ± 0.21	1.72 ± 0.30	1.60 ± 0.35
		Cy3-TR667	1.89 ± 0.20	1.82 ± 0.24	1.69 ± 0.19
Cer	2.07 ± 0.11	Cy3-5R667	-	1.92 ± 0.08	1.82 ± 0.14
		Cy3-TR667	-	1.86 ± 0.06	1.92 ± 0.11
		Cy3-2R9	-	-	1.82 ± 0.08

Для каждого экспериментального условия взвешенное по амплитуде среднее время жизни флуоресценции (A-WALF, amplitude-weighted average fluorescence lifetime) определялось попиксельно в 2–3 независимо полученных FLIM-изображениях с помощью пакета программного обеспечения Vista Vision Suite, version 212 (ISS).

Таблица 3. Последовательности, специфичность связывания и классификация ингибиторных пептидов (Toshchakov & Javmen, 2020 с дополнениями).

№	Пептид	TIR-прототип	Структурный регион TIR домена	Блокирующая последовательность*	Селективность ингибирования TLR	Верифицированные партнёры по связыванию	Сайт TIR-TIR взаимодействия
1	2R1	TLR2	N-концевой сегмент перед TIR доменом	RKPKKAPCRDVCYD	TLR2	TLR1, TLR6, MyD88	Site 1
2	2R3	TLR2	петля AB	ENSDPPFKLC	TLR2	TLR1, TLR6	
3	2BB	TLR2	петля BB	LHKRDCFVPGKWIID	TLR2, TLR4	–	
4	4R1	TLR4	N-концевой сегмент перед TIR домен	AGCKKYSRGESIYD	TLR4	TLR2 and TLR4	
5	4R3	TLR4	петля AB и β B	EEGVPRFHLIC	TLR4	–	
6	4BB	TLR4	β B, BB, и α B	LHYRDFIPGVAIAA	TLR2, TLR4**	TLR4	
7	9R3	TLR9	α A, AB	RGQLEECRGRWALR	TLR9	–	
8	9R34	TLR9	AB, β B, BB	GRWALRLCLEERD	TLR9	-	
9	9R34- Δ N	TLR9	AB, β B, BB	ALRLCLEERD	TLR9	TLR9, TIRAP	
10	TR3	TIRAP	α A, AB, β B	EGSQASLRCF	TLR2, TLR4	–	
11	TM4- Δ C	TRAM	BB, α B	IVFAEMPCG	TLR4	–	
12	TF4	TRIF	BB, α B	CEEFQVPGRGELH	TLR4	TLR4	
13	MyD88-BB	MyD88	BB	SDRDVLPGETCVWS	TLR4	TLR9, TIRAP, MyD88	
14	5R667	TLR5	α C''	WCLEAFSYAQGR	TLR2, TLR4 , TLR5, TLR9	TLR5, TIRAP, MyD88	Site 2

15	TR5	TIRAP	α B, BC	ELCQALSRSHCR	TLR4	–	Site 2
16	TR6	TIRAP	CC, α C	PGFLRDPWCKYQML	TLR2, TLR4	MyD88	
17	TR667	TIRAP	α C''	WCKYQMLQALTE	TLR4, TLR5	TLR5, TIRAP, MyD88	
18	TM6	TRAM	α C, CD	ENFLRDTWCNFQFY	TLR4	–	
19	TF5	TRIF	α B, BC	CLQDAIDHSGFT	TLR4	TLR4, TRAM	
20	1R9	TLR1	α D	PTNYHKLKTLMSR	TLR2	MyD88	Site 3
21	2R9	TLR2	DD, α D	PQRFCKLRKIMNT	TLR2, TLR4, TLR7, TLR9	TIRAP	
22	4R9	TLR4	α D	LRQQVELYRLLSR	TLR2, TLR4	TIRAP	
23	6R9	TLR6	α D	PSRYHKLRLMAQ	TLR2	TIRAP	
24	7R9	TLR7	α D	FLQLRKRLCGSS	TLR2, TLR4, TLR7, TLR9	TIRAP	
25	9R9	TLR9	DD, α D	RYVRLRQRLCRQS	TLR9	–	
26	TR9	TIRAP	DD, α D, DE, β E	AAYPPELRFMYVVD	TLR4	TLR2	
27	1R10	TLR1	DE, β E, EE	RTYLEWPTEKNKH	TLR2	–	Site 4
28	4 α E	TLR4	α E	HIFWRRLKNALLD	TLR4	TLR4	
29	6R10	TLR6	DE, β E, EE	RTYLEWPTEKGKR	TLR2	–	
30	7R11	TLR7	α E	PYFWQCLKNALATD	TLR2, TLR4, TLR7 , TLR9	TIRAP, MyD88	

31	9R11	TLR9	α E	RSFWAQLGMALTRD	TLR9	TLR9, TIRAP, MyD88	
32	TR11	TIRAP	α E	GGFYQVKEAVIHY	TLR4	—	

* — указанные «Блокирующие последовательности» были синтезированы и тестированы вместе с пептидным вектором пенетратином (RQIKIWFQNRRMKWKK), расположенным на N-конце конструкции (Табл.1).

** — в столбце «Верифицированные партнёры по связыванию» жирным шрифтом отмечены рецепторы, ингибиторная активность в отношении которых подтверждена в экспериментах *in vivo*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БП – блокирующий пептид

ДВБ – домен взаимодействия белков (protein interaction domain)

ДС – домен (клеточной) смерти (death domain)

ДСН-ЭПАГ – электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

ИФА – иммуноферментный анализ

КББС – Коллаборативный Банк Белковых Структур (The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank)

КММ – макрофаги, полученные из клеток костного мозга

МАПК – митоген-активируемая протеин киназа

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НАД – никотинамиддинуклеотид

ОТ-ПЦР – обратная транскрипция мРНК в сочетании с ПЦР с детекцией продукта блоттингом по Саузерну или в режиме реального времени

ПП – проникающий пептид-вектор

ППР – поверхностный плазмонный резонанс

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Рис. – рисунок

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ABC DLBCL – activated B-cell-like subtype of diffuse large B-cell lymphoma

AF – allele frequency

araLAM – arabinose-capped lipoarabinomannan

BMDM – bone marrow-derived macrophages (макрофаги, дифференцированные из клеток костного мозга)

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

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,4adiaza-s-indacene-2-propionyl)amino) hexanoic acid)

Cer – Cerulean (Лазурный) – вариант голубого флуоресцентного белка, характеризующийся повышенной фотостабильностью и однокомпонентным характером затухания флуоресценции в водных растворах (Rizzo et al., 2004)

CFP – cyan fluorescent protein (голубой флуоресцентный белок)

CHX – циклогексимид

СуЗ – цианин 3

DISC – death-inducing signaling complex

DLBCL – diffuse large B-cell lymphoma

DTT – дитиотрейтол

ECL – enhanced chemiluminescence

ERK (Erk) – extracellular signal-regulated kinase

FLIM – микроскопия времени жизни флуоресценции (fluorescence lifetime imaging microscopy)

FRET – Förster resonance energy transfer (Фёрстеровский резонансный перенос энергии)

FSL-1 – фибробласт-стимулирующий липопептид 1 (fibroblast-stimulating lipopeptide-1)

HPRT – hypoxanthine phosphoribosyltransferase

JE – cytokine, also known as monocyte-specific cytokine 1

JNK – c-Jun N-terminal kinase

iBMDM – immortalized bone marrow-derived macrophages

IL – интерлейкин

IL-1R – рецептор IL-1

IFN – интерферон

IKK α/β – inhibitor of nuclear factor κ B kinase subunits alpha and beta

iNOS – inducible NO synthase

IRAK – Interleukin-1 Receptor (IL-1R) Associated Kinase

IRF – interferon regulatory factor (фактор регуляции интерферонов)

IP-10 – interferon-inducible protein 10

LPS – липополисахарид

MCP-5 – monocyte chemoattractant protein 5

MMLV – транскриптаза вируса лейкемии мышей

MOI – multiplicity of infection (удельное количество вирионов нормализованное на количество заражаемых клеток)

MW – molecular weight

NAD – nicotinamide adenine dinucleotide

NEMO – NF-κB essential modulator

NF-κB – nuclear factor kappa B

OspC – *Borrelia burgdorferi* lipoprotein OspC

Pam2Cys, P2C or Pam2C – S-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2R,2S)-propyl)-(R)-Cys-Ser-Lys₄ OH

Pam3Cys, P3C or Pam3C – S-[2,3-бис(пальмитоил-окси)-(2-RS)-пропил]-N-пальмитоил-(R)-Cys-(S)-Ser-Lys₄-OH

PBS – фосфатно-солевой буфер

PDB – protein data bank (база данных белковых структур)

PMA – фобол-12-миристан-13-ацетат (phorbol myristate acetate)

Poly(I:C) – двуцепочечная полиинозиновая-полицитидиновая рибонуклеиновая кислота, агонист TLR3

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

R белки – (Resistance proteins) белки устойчивости растений, класс внутриклеточных рецепторов высших растений, имеющих общую доменную структуру, которая включает N-концевой TIR домен, центральный нуклеотид-связывающий домен (NB домен) и C-концевой домен лейциновых повторов (Leucine-Rich Repeats). R белки отвечают за распознавание фитопатогенов и развитие защитной реакции

RANTES – regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted, цитокин, также известный под именем CCL5 (chemokine (C-C motif) ligand 5)

RCSB PDB – Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB (база данных белковых структур <https://www.rcsb.org>)

RIG-I – retinoic acid-inducible gene 1

SARM1 – sterile alpha and TIR motif containing 1

SEAP – secreted embryonic alkaline phosphatase (секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза)

SH2 – Src homology domain 2

SH3 – Src homology domain 3

STAT-1 – signal transducer and activator of transcription 1

STF – mycobacterial soluble tuberculosis factor

TCID – Tissue Culture Infectious Dose (инфекционная доза в культуре ткани)

TCSPC – time-correlated single photon counting

TIR – ДВБ гомологичный Толл белкам насекомых, рецепторам интерлейкинов семейства интерлейкина 1, а также белкам сопротивляемости растений (TIR, Toll/IL-1R Resistance domain)

TIRAP – Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein, also known as MyD88 adapter-like

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

TNF – фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor)

TRAM/TICAM2 – TRIF-related adapter molecule

TRIF/TICAM1 – TIR domain-containing adapter protein-inducing interferon β

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Agashe, R. P., Lippman, S. M., & Kurzrock, R. (2022). JAK: Not Just Another Kinase. *Molecular Cancer Therapeutics*, 21(12), 1757–1764. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-22-0323>
- Agou, F., Courtois, G., Chiaravalli, J., Baleux, F., Coïc, Y. M., Traincard, F., Israël, A., and Véron, M. (2004). Inhibition of NF- κ B activation by peptides targeting NF- κ B essential modulator (NEMO) oligomerization, *J. Biol. Chem.*, 279, 54248-54257, <https://doi.org/10.1074/jbc.M406423200>.
- Alves ID, Bechara C, Walrant A, Zaltsman Y, Jiao CY, Sagan S. (2011). Relationships between membrane binding, affinity and cell internalization efficacy of a cell-penetrating peptide: penetratin as a case study. *PLoS One*, 6(9): e24096. doi: 10.1371/journal.pone.0024096.
- Anderson, K. V., Jürgens, G., & Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: The induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*, 42(3), 791–798.
- Atamas SP, Lockatell V, Todd NW, Papadimitriou JC, Rus V, Lugkey KN, Vogel SN, Toshchakov VY, Luzina IG. (2025). Therapeutic targeting of full-length interleukin-33 protein levels with cell-permeable decoy peptides attenuates fibrosis in the bleomycin model *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther*. 392(1):100008. DOI: 10.1124/jpet.123.002050.
- Attwood, M. M., Jonsson, J., Rask-Andersen, M., & Schiöth, H. B. (2020). Soluble ligands as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(10), 695–710. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0078-4>
- Avbelj M, Wolz OO, Fekonja O, Benčina M, Repič M, Mavri J, Krüger J, Schärfe C, Delmiro Garcia M, Panter G, Kohlbacher O, Weber AN, Jerala R. (2014). Activation of lymphoma-associated MyD88 mutations via allostery-induced TIR-domain oligomerization. *Blood*, 124(26), 3896-904. doi: 10.1182/blood-2014-05-573188
- Baek, M., F. DiMaio, I. Anishchenko, J. Dauparas, S. Ovchinnikov, G. R. Lee, J. Wang, Q. Cong, L. N. Kinch, R. Dustin Schaeffer, et al. (2021). Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science*, 373:871-876. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abj8754>
- Barber SA, Fultz MJ, Salkowski CA, Vogel SN. (1995). Differential expression of interferon regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-2, and interferon consensus sequence binding protein genes in lipopolysaccharide (LPS)-responsive and LPS-

- hyporesponsive macrophages. *Infect Immun.*, 63(2), 601-8. doi: 10.1128/iai.63.2.601-608.1995
- Bauer, S., Kirschning, C. J., Häcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., & Lipford, G. B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(16), 9237–9242. <https://doi.org/10.1073/pnas.161293498>
- Bauer S, Pigisch S, Hangel D, Kaufmann A, Hamm S. (2008). Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by Toll-like receptors 7, 8 and 9. *Immunobiology*, 213(3-4), 315-28. doi: 10.1016/j.imbio.2007.10.010
- Bayless, A. M., Chen, S., Ogden, S. C., Xu, X., Sidda, J. D., Manik, M. K., Li, S., Kobe, B., Ve, T., Song, L., Grant, M., Wan, L., & Nishimura, M. T. (2023). Plant and prokaryotic TIR domains generate distinct cyclic ADPR NADase products. *Science Advances*, 9(11), eade8487. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade8487>
- Bayless, A. M., & Nishimura, M. T. (2020). Enzymatic Functions for Toll/Interleukin-1 Receptor Domain Proteins in the Plant Immune System. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 11, p. 539). <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00539>
- Bechara C, Pallerla M, Zaltsman Y, Burlina F, Alves ID, Lequin O, Sagan S. Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis. *FASEB J.* 27(2), 738-49. doi: 10.1096/fj.12-216176.
- Bechara, C., & Sagan, S. (2013). Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Letters*, 587(12), 1693–1702. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.031>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T., Weissig, H., Shindyalov, I., & Bourne, P. (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235-242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Berman, H. M., T. Battistuz, T. N. Bhat, W. F. Bluhm, P. E. Bourne, K. Burkhardt, Z. Feng, G. L. Gilliland, L. Iype, S. Jain, et al. (2002). The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 58: 899-907
- von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku CL, Chrabieh M, Mustapha IB, Ghandil P, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Sirvent N, Guedes M, Vitor AB, Herrero-Mata MJ, Aróstegui JI, Rodrigo C, Alsina L, Ruiz-Ortiz E, Juan M, Fortuny C, Yagüe J, Antón J, Pascal M, Chang HH, Janniere L, Rose Y, Garty BZ, Chapel H, Issekutz A, Maródi L, Rodriguez-Gallego C, Banchereau J, Abel L, Li X, Chaussabel D, Puel A, Casanova JL. (2008). Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science*, 321(5889), 691-6. doi: 10.1126/science.1158298

- von Bernuth H, Picard C, Puel A, Casanova JL. (2012). Experimental and natural infections in MyD88- and IRAK-4-deficient mice and humans. *Eur J Immunol.*, 42(12), 3126-35. doi: 10.1002/eji.201242683
- Blasius, A. L., & Beutler, B. (2010). Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity*, 32(3), 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.012>
- Bonham, K. S., Orzalli, M. H., Hayashi, K., Wolf, A. I., Glanemann, C., Weninger, W., Iwasaki, A., Knipe, D. M., & Kagan, J. C. (2014). A promiscuous lipid-binding protein diversifies the subcellular sites of toll-like receptor signal transduction. *Cell*, 156(4), 705–716. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.019>
- Bonzheim I, Giese S, Deuter C, Süsskind D, Zierhut M, Waizel M, Szurman P, Federmann B, Schmidt J, Quintanilla-Martinez L, Coupland SE, Bartz-Schmidt KU, Fend F. (2015). High frequency of MYD88 mutations in vitreoretinal B-cell lymphoma: a valuable tool to improve diagnostic yield of vitreous aspirates. *Blood*, 126(1), 76-9. doi: 10.1182/blood-2015-01-620518
- Borsello, T., Clarkel, P. G. H., Hirt, L., Vercelli, A., Repici, M., Schorderet, D. F., Bogousslavsky, J., and Bonny, C. (2003). A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia, *Nat. Med.*, **9**, 1180-1186, <https://doi.org/10.1038/nm911>.
- Borst, J. W., & Visser, A. J. W. G. (2010). Fluorescence lifetime imaging microscopy in life sciences. *Measurement Science and Technology*, 21(10), 102002. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/21/10/102002>
- Chapuy B, Roemer MG, Stewart C, Tan Y, Abo RP, Zhang L, Dunford AJ, Meredith DM, Thorner AR, Jordanova ES, Liu G, Feuerhake F, Ducar MD, Illerhaus G, Gusenleitner D, Linden EA, Sun HH, Homer H, Aono M, Pinkus GS, Ligon AH, Ligon KL, Ferry JA, Freeman GJ, van Hummelen P, Golub TR, Getz G, Rodig SJ, de Jong D, Monti S, Shipp MA. (2016). Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas. *Blood*, 127(7), 869-81. doi: 10.1182/blood-2015-10-673236
- Chen, J., Sawyer, N., & Regan, L. (2013). Protein-protein interactions: General trends in the relationship between binding affinity and interfacial buried surface area. *Protein Science*, 22(4), 510–515. <https://doi.org/10.1002/pro.2230>
- Chin Chiang, & Beachy, P. A. (1994). Expression of a novel Toll-like gene spans the parasegment boundary and contributes to hedgehog function in the adult eye of *Drosophila*. In *Mechanisms of Development* (Vol. 47, Issue 3, pp. 225–239). [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(94\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0925-4773(94)90041-8)

- Choi, M., Rolle, S., Wellner, M., Cardoso, M. C., Scheidereit, C., Luft, F. C., and Kettritz, R. (2003). Inhibition of NF- κ B by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis, *Blood*, 102, 2259–2267, <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-296>
- Chothia, C., & Janin, J. (1975). Principles of protein-protein recognition. *Nature*, 256, 705–708.
- Cirl, C., Wieser, A., Yadav, M., Duerr, S., Schubert, S., Fischer, H., Stappert, D., Wantia, N., Rodriguez, N., Wagner, H., Svanborg, C., & Miethke, T. (2008). Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nature Medicine*, 14(4), 399–406. <https://doi.org/10.1038/nm1734>
- Clabbers, M. T. B., Holmes, S., Muusse, T. W., Vajjhala, P. R., Thygesen, S. J., Malde, A. K., Hunter, D. J. B., Croll, T. I., Flueckiger, L., Nanson, J. D., Rahaman, M. H., Aquila, A., Hunter, M. S., Liang, M., Yoon, C. H., Zhao, J., Zatsepin, N. A., Abbey, B., Sieracki, E., ... Ve, T. (2021). MyD88 TIR domain higher-order assembly interactions revealed by microcrystal electron diffraction and serial femtosecond crystallography. *Nature Communications*, 12(1), 2578. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22590-6>
- Conte, L. Lo, Chothia, C., & Janin, J. (1999). The atomic structure of protein-protein recognition sites. *Journal of Molecular Biology*, 285(5), 2177–2198. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2439>
- Couture, L. A., Piao, W., Ru, L. W., Vogel, S. N., & Toshchakov, V. Y. (2012). 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*, 287(29), 24641–24648. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.360925>
- Deguine, J., & Barton, G. M. (2014). MyD88: A central player in innate immune signaling. In *F1000Prime Reports* (Vol. 6). <https://doi.org/10.12703/P6-97>
- Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., & Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(14), 10444–10450. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)34080-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)34080-2)
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., & Reis e Sousa, C. (2004). Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA. *Science*, 303(5663), 1529–1531. <https://doi.org/10.1126/science.1093616>

- Digman, M. A., Caiolfa, V. R., Zamai, M., & Gratton, E. (2008). The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis. *Biophysical Journal*, 94(2). <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120154>
- Dinarello, C. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 117(14), 3720–3732. doi: 10.1182/blood-2010-07-273417
- Du X, Poltorak A, Silva M, Beutler B. (1999). Analysis of Tlr4-mediated LPS signal transduction in macrophages by mutational modification of the receptor. *Blood Cells Mol Dis.*, 25(5-6):328-38. doi: 10.1006/bcmd.1999.0262.
- Dutta, P., & Das, S. (2016). Mammalian Antimicrobial Peptides: Promising Therapeutic Targets Against Infection and Chronic Inflammation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(1), 99–129. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150703121819>
- D'Ursi, A. M., Giusti, L., Albrizio, S., Porchia, F., Esposito, C., Caliendo, G., Gargini, C., Novellino, E., Lucacchini, A., Rovero, P., and Mazzoni, M. R. (2006) A membrane-permeable peptide containing the last 21 residues of the G alpha(s) carboxyl terminus inhibits G(s)-coupled receptor signaling in intact cells: correlations between peptide structure and biological activity, *Mol. Pharmacol.*, 69, 727-736, <https://doi.org/10.1124/mol.105.017715>
- Elinav E., Strowig T., Henao-Mejia J., & Flavell R.A. (2011) Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity*, 34(5), 665–679. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.007
- Essuman, K., Summers, D. W., Sasaki, Y., Mao, X., DiAntonio, A., & Milbrandt, J. (2017). The SARM1 Toll/Interleukin-1 Receptor Domain Possesses Intrinsic NAD⁺ Cleavage Activity that Promotes Pathological Axonal Degeneration. *Neuron*, 93(6), 1334-1343.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.022>
- Essuman, K., Summers, D. W., Sasaki, Y., Mao, X., Yim, A. K. Y., DiAntonio, A., & Milbrandt, J. (2018). TIR Domain Proteins Are an Ancient Family of NAD⁺-Consuming Enzymes. *Current Biology*, 28(3), 421-430.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.12.024>
- Faggioli, L., Costanzo, C., Donadelli, M., & Palmieri, M. (2004). Activation of the interleukin-6 promoter by a dominant negative mutant of c-Jun. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1692(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.03.001>
- Fallerini C, Daga S, Mantovani S, Benetti E, Picchiotti N, Francisci D, Paciosi F, Schiaroli E, Baldassarri M, Fava F, Palmieri M, Ludovisi S, Castelli F, Quiros-Roldan E, Vaghi M, Rusconi S, Siano M, Bandini M, Spiga O, Capitani K, Furini S, Mari F; GEN-COVID

- Multicenter Study; Renieri A, Mondelli MU, Frullanti E. (2021). Association of Toll-like receptor 7 variants with life-threatening COVID-19 disease in males: findings from a nested case-control study. *Elife*, 10, e67569. doi: 10.7554/eLife.67569
- Fitzgerald, K. A., Palsson-Mcdermott, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mansell, A. S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M. T., McMurray, D., Smith, D. E., Sims, J. E., Bird, T. A., & O'Neill, L. A. J. (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*, 413(6851), 78–83. <https://doi.org/10.1038/35092578>
- Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M., & Golenbock, D. T. (2003). LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF- κ B involves the toll adapters TRAM and TRIF. *Journal of Experimental Medicine*, 198(7), 1043–1055. <https://doi.org/10.1084/jem.20031023>
- Frankel, A. D., & Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55(6), 1189–1193. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90263-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90263-2)
- Gay, N. J., & Keith, F. J. (1991). Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*, 351(6325), 355–356. <https://doi.org/10.1038/351355b0>
- Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., & Madara, J. L. (2001). Cutting Edge: Bacterial Flagellin Activates Basolaterally Expressed TLR5 to Induce Epithelial Proinflammatory Gene Expression. *The Journal of Immunology*, 167(4), 1882–1885. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.1882>
- Goligorsky, M. S., Noiri, E., Kessler, H., and Romanov, V. (1998) Therapeutic effect of arginine-glycine-aspartic acid peptides in acute renal injury, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 25, 276-279, <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1998.t01-2-.x>.
- Green, M., & Loewenstein, P. M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*, 55(6), 1179–1188. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90262-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90262-0)
- Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18, 2714-2723. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181505>
- Hagberg L, Hull R, Hull S, McGhee JR, Michalek SM, Svanborg Edén C. (1984). Difference in susceptibility to gram-negative urinary tract infection between C3H/HeJ and C3H/HeN mice. *Infect Immun.*, 46(3), 839-44. doi: 10.1128/iai.46.3.839-844.1984.

- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., & Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832), 1099–1103. <https://doi.org/10.1038/35074106>
- He B, Khemaissa S, Cardon S, Marquant R, Illien F, Ravault D, Burlina F, Sachon E, Walrant A, Sagan S. Translocation of penetratin-like peptides involving calcium-dependent interactions between glycosaminoglycans and phosphocholine headgroups of the membrane lipid bilayer. *RSC Chem Biol.*, 6(9), 1391-1402. doi: 10.1039/d5cb00099h.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., & Bauer, S. (2004). Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science*, 303(5663), 1526–1529. <https://doi.org/10.1126/science.1093620>
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., & Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88–dependent signaling pathway. *Nature Immunology*, 3(2), 196–200. <https://doi.org/10.1038/ni758>
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., & Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813), 740–745. <https://doi.org/10.1038/35047123>
- Henriques, S. T., Melo, M. N., & Castanho, M. A. R. B. (2006). Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? *Biochemical Journal*, 399(1), 1–7. <https://doi.org/10.1042/BJ20061100>
- Hiromura, M., Okada, F., Obata, T., Auguin, D., Shibata, T., Roumestand, C., and Noguchi, M. (2004). Inhibition of Akt kinase activity by a peptide spanning the β A strand of the proto-oncogene TCL1, *J. Biol. Chem.*, 279, 53407-53418, <https://doi.org/10.1074/jbc.M403775200>.
- Hirschfeld, M., Weis, J. J., Toshchakov, V., Salkowski, C. A., Cody, M. J., Ward, D. C., Qureshi, N., Michalek, S. M., & Vogel, S. N. (2001). Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infection and Immunity*, 69(3), 1477–1482. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1477-1482.2001>

- Horng, T., Barton, G. M., Flavell, R. A., & Medzhitov, R. (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature*, 420(6913), 329–333. <https://doi.org/10.1038/nature01180>
- Horng, T., Barton, G. M., & Medzhitov, R. (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nature Immunology*, 2(9), 835–841.
- Horsefield, S., Burdett, H., Zhang, X., Manik, M. K., Shi, Y., Chen, J., Qi, T., Gilley, J., Lai, J., Rank, M. X., & Others. (2019). NAD⁺ cleavage activity by animal and plant TIR domains in cell death pathways. *Science*, 365(6455), 793–799.
- Hultmark, D. (1994). Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 199(1), 144–146. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1206>
- Imai, Y., Kuba, K., Neely, G. G., Yaghubian-Malhami, R., Perkmann, T., van Loo, G., Ermolaeva, M., Veldhuizen, R., Leung, Y. H. C., Wang, H., Liu, H., Sun, Y., Pasparakis, M., Kopf, M., Mech, C., Bavari, S., Peiris, J. S. M., Slutsky, A. S., Akira, S., ... Penninger, J. M. (2008). Identification of Oxidative Stress and Toll-like Receptor 4 Signaling as a Key Pathway of Acute Lung Injury. *Cell*, 133(2), 235–249. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.043>
- Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Javmen, A., Szmazinski, H., Lakowicz, J. R., & Toshchakov, V. Y. (2018). Blocking TIR Domain Interactions in TLR9 Signaling. *The Journal of Immunology*, 201(3), 995–1006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800194>
- Javmen, A., Szmazinski, H., Lakowicz, J. R., & Toshchakov, V. Y. (2020). Frontline Science: Targeting the TLR7 signalosome assembly. *Journal of Leukocyte Biology*, 108(6), 1697–1706. <https://doi.org/10.1002/JLB.2HI0819-180R>
- Javmen, A., Zou, J., Nallar, S. C., Szmazinski, H., Lakowicz, J. R., Gewirtz, A. T., & Toshchakov, V. Y. (2023). TLR5-derived, TIR-interacting decoy peptides to inhibit TLR signaling. *Journal of Immunology*, 210(9), 1428–1436. <https://doi.org/https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200371>
- Jefferies, C. A. (2019). Regulating IRFs in IFN driven disease. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00325>
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., & Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 88(5), 1864–1868.
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1864>
- Joliot, A., & Prochiantz, A. (2004). Transduction peptides: From technology to physiology. *Nature Cell Biology*, 6(3), 189–196. <https://doi.org/10.1038/ncb0304-189>
- Jones, B. W., Means, T. K., Heldwein, K. A., Keen, M. A., Hill, P. J., Belisle, J. T., & Fenton, M. J. (2001). Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *Journal of Leukocyte Biology*, 69(6), 1036–1044.
- Jones, S., & Thornton, J. M. (1996). Principles of protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(1), 13–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.13>
- Kagan, J. C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., & Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- β . *Nature Immunology*, 9(4), 361–368. <https://doi.org/10.1038/ni1569>
- Kardani, K., & Bolhassani, A. (2021). Cpps site 2.0: An Available Database of Experimentally Validated Cell-Penetrating Peptides Predicting their Secondary and Tertiary Structures. *Journal of Molecular Biology*, 433(11), 166703. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.002>
- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., & Uematsu, S. (2005). Cell Type-Specific Involvement of RIG-I in Antiviral Response rapid induction of type I interferons (IFNs) and proinflammatory cytokines, leading to subsequent activation. *Immunity*, 23, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.04.010>
- Kauffman, W. B., Fuselier, T., He, J., & Wimley, W. C. (2015). Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(12), 749–764. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.10.004>
- Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*, 34(5), 637–650. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>
- Kawai, T., Ikegawa, M., Ori, D., & Akira, S. (2024). Decoding Toll-like receptors: Recent insights and perspectives in innate immunity. In *Immunity* (Vol. 57, Issue 4, pp. 649–673). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.03.004>
- Ke, Y., Li, W., Wang, Y., Yang, M., Guo, J., Zhan, S., Du, X., Wang, Z., Yang, M., Li, J., Li, W., & Chen, Z. (2016). Inhibition of TLR4 signaling by Brucella TIR-containing

- protein TcpB-derived decoy peptides. *International Journal of Medical Microbiology*, 306(6), 391–400. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.05.003>
- Kelemen, B. R., Hsiao, K., and Goueli, S. A. (2002) Selective *in vivo* inhibition of mitogen-activated protein kinase activation using cell-permeable peptides, *J. Biol. Chem.*, **277**, 8741-8748, <https://doi.org/10.1074/jbc.M108459200>
- Kirk, P, & Bazan JF. (2005). Pathogen recognition: TLRs throw us a curve. *Immunity*, 23(4):347-50. doi: 10.1016/j.immuni.2005.09.008. PMID: 16226500.
- Koopal, B., Potocnik, A., Mutte, S. K., Aparicio-Maldonado, C., Lindhoud, S., Vervoort, J. J. M., Brouns, S. J. J., & Swarts, D. C. (2022). Short prokaryotic Argonaute systems trigger cell death upon detection of invading DNA. *Cell*, 185(9), 1471-1486.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.03.012>
- Kopydlowski, K. M., Salkowski, C. A., Cody, M. J., van Rooijen, N., Major, J., Hamilton, T. A., & Vogel, S. N. (1999). Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(3), 1537–1544.
- Koushik, S. V., & Vogel, S. S. (2008). Energy migration alters the fluorescence lifetime of Cerulean: implications for fluorescence lifetime imaging Forster resonance energy transfer measurements. *Journal of Biomedical Optics*, 13(3), 031204. <https://doi.org/10.1117/1.2940367>
- Kraan W, Horlings HM, van Keimpema M, Schilder-Tol EJ, Oud ME, Scheepstra C, Kluin PM, Kersten MJ, Spaargaren M, Pals ST. (2013). High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites. *Blood Cancer J.*, 3(9), e139. doi: 10.1038/bcj.2013.28
- Kraan W, van Keimpema M, Horlings HM, Schilder-Tol EJ, Oud ME, Noorduynd LA, Kluin PM, Kersten MJ, Spaargaren M, Pals ST. (2014). High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in primary testicular diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, 28(3), 719-20. doi: 10.1038/leu.2013.348
- Kwon, H. K., Patra, M. C., Shin, H. J., Gui, X., Achek, A., Panneerselvam, S., Kim, D. J., Song, S. J., Hong, R., Kim, K. S., Kim, Y. G., Lee, F. Y., Hahm, D. H., Lee, S. H., & Choi, S. (2019). A cell-penetrating peptide blocks Toll-like receptor-mediated downstream signaling and ameliorates autoimmune and inflammatory diseases in mice. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 51, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0244-0>
- Lakowicz, J. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (J. Lakowicz, Ed.; 3rd ed.). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>

- Lapin, D., Johannedrees, O., Wu, Z., Li, X., & Parker, J. E. (2022). Molecular innovations in plant TIR-based immunity signaling. *Plant Cell*, 34(5), 1479–1496. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac035>
- Layoun A, Samba M, Santos MM. (2015). Isolation of murine peritoneal macrophages to carry out gene expression analysis upon Toll-like receptors stimulation. *J Vis Exp.*, 29(98), e52749. doi: 10.3791/52749
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/Cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6), 973–983. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80172-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5)
- Letunic I, & Bork P. (2018). 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* 46(D1), D493-D496. doi: 10.1093/nar/gkx922.
- Levitt, M., & Chothia, C. (1976). Structural Patterns in Globular Proteins. *Nature*, 261, 552–558.
- Lin, S. C., Lo, Y. C., & Wu, H. (2010). Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*, 465(7300), 885–890. <https://doi.org/10.1038/nature09121>
- Lin Z, Lu J, Zhou W, Shen Y. (2012). Structural insights into TIR domain specificity of the bridging adaptor Mal in TLR4 signaling. *PLoS One*, 7(4), e34202. doi: 10.1371/journal.pone.0034202
- Lopatina, A., Tal, N., & Sorek, R. (2020). Abortive Infection: Bacterial Suicide as an Antiviral Immune Strategy. In *Annual Review of Virology* (Vol. 7, pp. 371–384). <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-011620-040628>
- Low, W., Mortlock, A., Petrovska, L., Dottorini, T., Dougan, G., & Crisanti, A. (2007). Functional cell permeable motifs within medically relevant proteins. *Journal of Biotechnology*, 129(3), 555–564. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.01.019>
- Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Iwasaki, A., & Flavell, R. A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(15):5598-603. doi: 10.1073/pnas.0400937101.
- Luo, Y., Smith, R. A., Guan, R., Liu, X., Klinghofer, V., Shen, J., Hutchins, C., Richardson, P., Holzman, T., Rosenberg, S.H., and Giranda, V. L. (2004). Pseudosubstrate peptides inhibit Akt and induce cell growth inhibition, *Biochemistry*, 43, 1254-1263, <https://doi.org/10.1021/bi034515p>.

- Lysakova, E. V., Burak, M. Y., Larin, I., Chuvpilo, S. A., Laktyushkin, V. S., Shumeev, A. N., Pismennyi, I. E., Toshchakov, V. Y., Bobrov, M. Y., & Rybtsov, S. A. (2026). Stability of Myeloid Cell Phenotype and Function Across a Broad Age Range in Humans and Cynomolgus Monkeys, and a Dominant Contribution of Humoral Factors in the Control of Bacterial Infection. *Biomedicines*, 14(1), 71. DOI: 10.3390/biomedicines14010071
- Ma M, Jiang W, Zhou R. (2024). DAMPs and DAMP-sensing receptors in inflammation and diseases. *Immunity*, 57(4), 752-771.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.03.002>.
- van der Made CI, Simons A, Schuurs-Hoeijmakers J, van den Heuvel G, Mantere T, Kersten S, van Deuren RC, Steehouwer M, van Reijmersdal SV, Jaeger M, Hofste T, Astuti G, Corominas Galbany J, van der Schoot V, van der Hoeven H, Hagmolen Of Ten Have W, Klijn E, van den Meer C, Fiddelaers J, de Mast Q, Bleeker-Rovers CP, Joosten LAB, Yntema HG, Gilissen C, Nelen M, van der Meer JWM, Brunner HG, Netea MG, van de Veerdonk FL, Hoischen A. (2020). Presence of Genetic Variants Among Young Men With Severe COVID-19. *JAMA.*, 324(7), 663-673. doi: 10.1001/jama.2020.13719
- Mahmood, T., & Yang, P. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North Am J Med Sci*, 4(9), 429–434.
- Malacrida, L., Ranjit, S., Jameson, D. M., & Gratton, E. (2025). *The Phasor Plot: A Universal Circle to Advance Fluorescence Lifetime Analysis and Interpretation*.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062920>
- Mantovani S, Daga S, Fallerini C, Baldassarri M, Benetti E, Picchiotti N, Fava F, Gallì A, Zibellini S, Bruttini M, Palmieri M, Croci S, Amitrano S, Alaverdian D, Capitani K, Furini S, Mari F, Meloni I; GEN-COVID Multicenter Study; Frullanti E, Mondelli MU, Renieri A. (2022). Rare variants in Toll-like receptor 7 results in functional impairment and downregulation of cytokine-mediated signaling in COVID-19 patients. *Genes Immun.* 23(1), 51-56. doi: 10.1038/s41435-021-00157-1.
- Maruta, N., Sorbello, M., Lim, B. Y. J., McGuinness, H. Y., Shi, Y., Ve, T., & Kobe, B. (2023). TIR domain-associated nucleotides with functions in plant immunity and beyond. *Current Opinion in Plant Biology*, 73, 102364.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102364>
- May, M. J., D'Acquisto, F., Madge, L. A., Glöckner, J., Pober, J. S., and Ghosh, S. (2000). Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex, *Science*, 289, 1550-1554, <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1550>

- Mayer, B. J. (2015). The discovery of modular binding domains: Building blocks of cell signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(11), 691–698. <https://doi.org/10.1038/nrm4068>
- McGaughey, G. B., Gagné, M., & Rappé, A. K. (1998). π -Stacking interactions. Alive and well in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 273(25), 15458–15463. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.25.15458>
- Medvedev AE. (2013). Toll-like receptor polymorphisms, inflammatory and infectious diseases, allergies, and cancer. *J Interferon Cytokine Res.*, 33(9), 467-84. doi: 10.1089/jir.2012.0140
- Medvedev AE, Lentschat A, Kuhns DB, Blanco JC, Salkowski C, Zhang S, Arditi M, Gallin JI, Vogel SN. (2003). Distinct mutations in IRAK-4 confer hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and interleukin-1 in a patient with recurrent bacterial infections. *J Exp Med.*, 198(4), 521-31. doi: 10.1084/jem.20030701
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (2000). The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends in Microbiology*, 8(10), 452–456.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394–397. <https://doi.org/10.1038/41131>
- Milletti, F. (2012). Cell-penetrating peptides: Classes, origin, and current landscape. *Drug Discovery Today*, 17(15–16), 850–860. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.002>
- Mitchell, D. J., Kim, D. T., Steinman, L., Fathman, C. G., & Rothbard, J. B. (2000). Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *The Journal of Peptide Research: Official Journal of the American Peptide Society*, 56(5), 318–325. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2000.00723.x>
- Montesinos-Rongen M, Godlewska E, Brunn A, Wiestler OD, Siebert R, Deckert M. (2011). Activating L265P mutations of the MYD88 gene are common in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol.*, 122(6), 791-2. doi: 10.1007/s00401-011-0891-2
- Nakase, I., Konishi, Y., Ueda, M., Saji, H., & Futaki, S. (2012). Accumulation of arginine-rich cell-penetrating peptides in tumors and the potential for anticancer drug delivery in vivo. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 159(2), 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.016>

- Neuwald A.F., Kannan N, Poleksic A, Hata N, Liu J.S. (2003) Ran's C-terminal, basic patch, and nucleotide exchange mechanisms in light of a canonical structure for Rab, Rho, Ras, and Ran GTPases. *Genome Res.*, 13(4):673-92. doi: 10.1101/gr.862303.
- Neuwald, A. F. (2009). Rapid detection, classification and accurate alignment of up to a million or more related protein sequences. *Bioinformatics*, 25(15), 1869–1875. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp342>
- Neuwald, A. F. (2014a). A bayesian sampler for optimization of protein domain hierarchies. *Journal of Computational Biology*, 21(3), 269–286. <https://doi.org/10.1089/cmb.2013.0099>
- Neuwald, A. F. (2014b). Evaluating, comparing, and interpreting protein domain hierarchies. *Journal of Computational Biology*, 21(4), 287–302. <https://doi.org/10.1089/cmb.2013.0098>
- Neuwald A. F. (2014c). Protein domain hierarchy Gibbs sampling strategies. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 13(4):497-517. doi: 10.1515/sagmb-2014-0008. PMID: 24988248.
- Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim KH, Kohlhammer H, Xu W, Yang Y, Zhao H, Shaffer AL, Romesser P, Wright G, Powell J, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Ott G, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Staudt LM. (2011). Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*, 470(7332), 115-9. doi: 10.1038/nature09671
- Nimma, S., Gu, W., Maruta, N., Li, Y., Pan, M., Saikot, F. K., Lim, B. Y. J., McGuinness, H. Y., Zaoti, Z. F., Li, S., Desa, S., Manik, M. K., Nanson, J. D., & Kobe, B. (2021). Structural Evolution of TIR-Domain Signalosomes. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.784484>
- Nooren, I. M. A., & Thornton, J. M. (2003). Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions. *Journal of Molecular Biology*, 325(5), 991–1018. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01281-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01281-0)
- Núñez G. (2011) Intracellular sensors of microbes and danger. *Immunol. Rev.*, 243(1), 5–8. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01058.x
- O'Brien AD, Rosenstreich DL, Scher I, Campbell GH, MacDermott RP, Formal SB. (1980). Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the LPS gene. *J Immunol.*, 124(1), 20-4.

- Ofir, G., Herbst, E., Baroz, M., Cohen, D., Millman, A., Doron, S., Tal, N., Malheiro, D. B. A., Malitsky, S., Amitai, G., & Sorek, R. (2021). Antiviral activity of bacterial TIR domains via immune signalling molecules. In *Nature* (Vol. 600, Issue 7887, pp. 116–120). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04098-7>
- Ogura Y., Inohara N., Benito A., Chen F.F., Yamaoka S., & Núñez G. (2001) Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- κ B. *J. Biol. Chem.*, 276(7), 4812–4818. doi: 10.1074/jbc.M008072200
- Ohmori, Y., & Hamilton, T. A. (2001). Requirement for STAT1 in LPS-induced gene expression in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 69(4), 598–604.
- O'Neill LA, Bryant CE, Doyle SL. (2009). Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol Rev.*, 61(2), 177–97. doi: 10.1124/pr.109.001073
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T., & Seya, T. (2003a). TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nature Immunology*, 4(2), 161–167. <https://doi.org/10.1038/ni886>
- Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M., & Seya, T. (2003b). TIR-containing Adapter Molecule (TICAM)-2, a Bridging Adapter Recruiting to Toll-like Receptor 4 TICAM-1 That Induces Interferon- β . *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 49751–49762. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305820200>
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., & Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13766–13771. <https://doi.org/10.1073/pnas.250476497>
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*, 4(11), 2411–2423. <https://doi.org/10.1002/pro.5560041120>
- Park, C. B., Yi, K. S., Matsuzaki, K., Kim, M. S., & Kim, S. C. (2000). Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), 8245–8250. <https://doi.org/10.1073/pnas.150518097>
- Park, H. H., Logette, E., Raunser, S., Cuenin, S., Walz, T., Tschopp, J., & Wu, H. (2007). Death Domain Assembly Mechanism Revealed by Crystal Structure of

- the Oligomeric PIDDosome Core Complex. *Cell*, 128(3), 533–546.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.019>
- Park, J., Ryu, J., Kim, K.-A., Lee, H. J., Bahn, J. H., Han, K., Choi, E. Y., Lee, K. S., Kwon, H. Y., & Choi, S. Y. (2002). Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. *The Journal of General Virology*, 83(Pt 5), 1173–1181. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-5-1173>
- Pawson, T., & Nash, P. (2003). Assembly of Cell Regulatory Systems Through Protein Interaction Domains. *Science*, 300, 445–452.
<https://doi.org/10.1126/science.1083653>
- Piao, W., Ru, L. W., Piepenbrink, K. H., Sundberg, E. J., Vogel, S. N., & Toshchakov, V. Y. (2013a). 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 of the United States of America*, 110(47), 19036–19041.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1313575110>
- Piao, W., Ru, L. W., & Toshchakov, V. Y. (2016). Differential adapter recruitment by TLR2 co-receptors. *Pathogens and Disease*, 74(5), ftw043.
<https://doi.org/10.1093/femspd/ftw043>
- Piao, W., Shirey, K. A., Ru, L. W., Lai, W., Szmanski, H., Snyder, G. A., Sundberg, E. J., Lakowicz, J. R., Vogel, S. N., & Toshchakov, V. Y. (2015). A Decoy Peptide that Disrupts TIRAP Recruitment to TLRs Is Protective in a Murine Model of Influenza. *Cell Reports*, 11(12), 1941–1952. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.035>
- Piao, W., Vogel, S. N., & Toshchakov, V. Y. (2013b). Inhibition of TLR4 signaling by TRAM-derived decoy peptides in vitro and in vivo. *Journal of Immunology*, 190(5).
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202703>
- Picard C, von Bernuth H, Ku CL, Yang K, Puel A, Casanova JL. (2007). Inherited human IRAK-4 deficiency: an update. *Immunol Res.*, 38(1-3), 347-52. doi: 10.1007/s12026-007-0006-2
- Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku CL, Bustamante J, Yang K, Soudais C, Dupuis S, Feinberg J, Fieschi C, Elbim C, Hitchcock R, Lammas D, Davies G, Al-Ghonaïum A, Al-Rayes H, Al-Jumaah S, Al-Hajjar S, Al-Mohsen IZ, Frayha HH, Rucker R, Hawn TR, Aderem A, Tufenkeji H, Haraguchi S, Day NK, Good RA, Gougerot-Pocidalo MA, Ozinsky A, Casanova JL. (2003). Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science*, 299(5615), 2076-9. doi: 10.1126/science.1081902

- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., & Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282(5396), 2085–2088. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2085>
- Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M., & Langel, U. (1998). Cell penetration by transportan. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12(1), 67–77. <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.1.67>
- Prochiantz, A., & Di Nardo, A. A. (2022). Shuttling Homeoproteins and Their Biological Significance. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2383, 33–44. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1752-6_2
- Qureshi ST, Larivière L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med*. 189(4):615-25. doi: 10.1084/jem.189.4.615. Erratum in: *J Exp. Med.*, 1999 May 3;189(9):following 1518.
- Rallabhandi P, Nhu QM, Toshchakov VY, Piao W, Medvedev AE, Hollenberg MD, Fasano A, Vogel SN. (2008). Analysis of proteinase-activated receptor 2 and TLR4 signal transduction: a novel paradigm for receptor cooperativity. *J Biol Chem.*, 283(36), 24314-25. DOI: 10.1074/jbc.M804800200
- Rana, R. R., Zhang, M., Spear, A. M., Atkins, H. S., & Byrne, B. (2013). Bacterial TIR-containing proteins and host innate immune system evasion. *Medical Microbiology and Immunology*, 202(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00430-012-0253-2>
- Reveret, L., Leclerc, M., Morin, F., Émond, V., & Calon, F. (2023). Pharmacokinetics, biodistribution and toxicology of novel cell-penetrating peptides. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37280-0>
- Rhee, S. H., Jones, B. W., Toshchakov, V., Vogel, S. N., & Fenton, M. J. (2003). Toll-like receptors 2 and 4 activate STAT1 serine phosphorylation by distinct mechanisms in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 278(25), 22506–22512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208633200>
- Richard, K., Piepenbrink, K. H., Shirey, K. A., Gopalakrishnan, A., Nallar, S., 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. (2021). A mouse model of human TLR4 D299G/T399I SNPs reveals mechanisms of altered LPS and pathogen

- responses. *Journal of Experimental Medicine*, 218(2), e20200675.
<https://doi.org/10.1084/JEM.20200675>
- Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2002). Natural β -sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(5), 2754–2759. <https://doi.org/10.1073/pnas.052706099>
- Rizzo, M. A., Springer, G. H., Granada, B., & Piston, D. W. (2004). An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nature Biotechnology*, 22(4), 445–449. <https://doi.org/10.1038/nbt945>
- Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., Hood, L. E., & Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. In *PNAS July* (Vol. 5). www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0502272102
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., & Bazan, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 95, Issue 2, pp. 588–593). <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.588>
- Ronni T, Agarwal V, Haykinson M, Haberland ME, Cheng G, Smale ST. (2003). Common interaction surfaces of the toll-like receptor 4 cytoplasmic domain stimulate multiple nuclear targets. *Mol Cell Biol.*, 23(7), 2543-55. doi: 10.1128/MCB.23.7.2543-2555.2003.
- Salcedo, S. P., Marchesini, M. I., Degos, C., Terwagne, M., Bargen, K. Von, Lepidi, H., Herrmann, C. K., Santos Lacerda, T. L., Imbert, P. R. C., Pierre, P., Alexopoulou, L., Letesson, J. J., Commerci, D. J., & Gorvel, J. P. (2013). BtpB, a novel *Brucella* TIR-containing effector protein with immune modulatory functions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(JUL). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00028>
- Salcedo, S. P., Marchesini, M. I., Lelouard, H., Fugier, E., Jolly, G., Balor, S., Muller, A., Lapaque, N., Demaria, O., Alexopoulou, L., Commerci, D. J., Ugalde, R. A., Pierre, P., & Gorvel, J. P. (2008). *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. In *PLoS Pathogens* (Vol. 4, Issue 2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040021>
- Sarko, D., Beijer, B., Garcia Boy, R., Nothelfer, E.-M., Leotta, K., Eisenhut, M., Altmann, A., Haberkorn, U., & Mier, W. (2010). The Pharmacokinetics of Cell-Penetrating Peptides. *Molecular Pharmaceutics*, 7(6), 2224–2231. <https://doi.org/10.1021/mp100223d>

- Schröder NW, Schumann RR. (2005). Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis.*, 5(3), 156-64. doi: 10.1016/S1473-3099(05)01308-3
- Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., & Dowdy, S. F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5433), 1569–1572. <https://doi.org/10.1126/science.285.5433.1569>
- Shah, M., Kim, G. Y., Achek, A., Cho, E. Y., Baek, W. Y., Choi, Y. S., Lee, W. H., Kim, D. J., Lee, S. H., Kim, W., Kim, S. S., Cheong, J. Y., Suh, C. H., & Choi, S. (2020). The α C helix of TIRAP holds therapeutic potential in TLR-mediated autoimmune diseases. *Biomaterials*, 245(March), 119974. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119974>
- Shirey, K. A., Lai, W., Scott, A. J., Lipsky, M., Mistry, P., Pletneva, L. M., Karp, C. L., McAlees, J., Gioannini, T. L., Weiss, J., Chen, W. H., Ernst, R. K., Rossignol, D. P., Gusovsky, F., Blanco, J. C. G., & Vogel, S. N. (2013). The TLR4 antagonist Eritoran protects mice from lethal influenza infection. *Nature*, 497(7450), 498–502. <https://doi.org/10.1038/nature12118>
- Slack, J. L., Schooley, K., Bonnert, T. P., Mitcham, J. L., Qwarnstrom, E. E., Sims, J. E., & Dower, S. K. (2000). Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 4670–4678. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.4670>
- Smirnova I, Hamblin MT, McBride C, Beutler B, Di Rienzo A. (2001). Excess of rare amino acid polymorphisms in the Toll-like receptor 4 in humans. *Genetics*, 158(4), 1657-64. doi: 10.1093/genetics/158.4.1657
- Snyder, G. A., Cirl, C., Jiang, J., Chen, K., Waldhuber, A., Smith, P., Römmler, F., Snyder, N., Fresquez, T., Dürr, S., Tjandra, N., Miethke, T., & Xiao, T. S. (2013). Molecular mechanisms for the subversion of MyD88 signaling by TcpC from virulent uropathogenic Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), 6985–6990. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215770110>
- Spoel, S., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(2), 89-100. doi: 10.1038/nri3141.

- Sun, Z., Huang, J., Fishelson, Z., Wang, C., & Zhang, S. (2023). Cell-Penetrating Peptide-Based Delivery of Macromolecular Drugs: Development, Strategies, and Progress. *Biomedicines*, *11*, 1971. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11071971>
- Szmacinski, H., Toshchakov, V., Piao W, Lakowicz, J.R. (2013). Imaging of protein secretion from a single cell using plasmonic substrates. *Bionanoscience*. *3*(1), 30-36. DOI: 10.1007/s12668-013-0076-7
- Szmacinski, H., Toshchakov, V., & Lakowicz, J. R. (2014). Application of phasor plot and autofluorescence correction for study of heterogeneous cell population. *Journal of Biomedical Optics*, *19*(4), 046017. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.19.4.046017>
- Takeuchi O, Hoshino K, and Akira S. (2000). Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol.*, **165**, 5392–5396. doi: 10.4049/jimmunol.165.10.5392
- Takeuchi, O., Kawai, T., Mühlrad, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., & Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International Immunology*, *13*(7). <https://doi.org/10.1093/intimm/13.7.933>
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., & Akira, S. (2002). Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. *The Journal of Immunology*, *169*(1), 10–14. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.1.10>
- Toshchakov, V., Basu, S., Fenton, M. J., & Vogel, S. N. (2005). Differential involvement of BB loops of Toll-IL-1 resistance (TIR) domain-containing adapter proteins in TLR4- versus TLR2-mediated signal transduction. *Journal of Immunology*, *175*(1), 494-500. doi: 10.4049/jimmunol.175.1.494.
- 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. (2003). 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*, *9*(3), 169–175. <https://doi.org/10.1179/096805103125001577>
- 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. (2002). TLR4, but not TLR2, mediates IFN- β -induced STAT1 α/β -dependent gene expression in macrophages. *Nature Immunology*, *3*(4), 392–398. <https://doi.org/10.1038/ni774>
- Toshchakov, V. U., Basu, S., Fenton, M. J., & Vogel, S. N. (2005). 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*, 175(1), 494–500. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.1.494>
- Toshchakov, V. Y. (2024). Peptide-Based Inhibitors of the Induced Signaling Protein Interactions: Current State and Prospects. *Biochemistry (Moscow)*, 89(5), 784–798. <https://doi.org/10.1134/S000629792405002X>
- Toshchakov, V. Y., Fenton, M. J., & Vogel, S. N. (2007a). Cutting Edge: Differential Inhibition of TLR Signaling Pathways by Cell-Permeable Peptides Representing BB Loops of TLRs. *The Journal of Immunology*, 178(5), 2655–2660. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2655>
- Toshchakov, V. Y., & Javmen, A. (2020). Targeting the TLR signalosome with TIR domain-derived cell-permeable decoy peptides: the current state and perspectives. *Innate Immunity*, 26(1), 35–47. <https://doi.org/10.1177/1753425919844310>
- Toshchakov, V. Y., & Neuwald, A. F. (2020). A survey of TIR domain sequence and structure divergence. *Immunogenetics*, 72(3), 181–203. <https://doi.org/10.1007/s00251-020-01157-7>
- Toshchakov, V. Y., Szmanski, H., Couture, L. A., Lakowicz, J. R., & Vogel, S. N. (2011). Targeting TLR4 signaling by TLR4 Toll/IL-1 receptor domain-derived decoy peptides: identification of the TLR4 Toll/IL-1 receptor domain dimerization interface. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(8), 4819–4827. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002424>
- Toshchakov, V. Y., & Vogel, S. N. (2007). 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*, 7(7), 1035–1050. <https://doi.org/10.1517/14712598.7.7.1035>
- Treon SP, Cao Y, Xu L, Yang G, Liu X, Hunter ZR. (2014). Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*, 123(18), 2791-6. doi: 10.1182/blood-2014-01-550905
- Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. (1999). Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96(25), 14459-63. doi: 10.1073/pnas.96.25.14459.
- UniProt Consortium. (2025). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Res.*, 53(D1), D609-D617. doi: 10.1093/nar/gkae1010

- Van der Biezen, EA., & Jones, JD. (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci.*, 23(12), 454–456.
- Ve, T., Vajjhala, P. R., Hedger, A., Croll, T., Dimaio, F., Horsefield, S., Yu, X., Lavrencic, P., Hassan, Z., Morgan, G. P., Mansell, A., Mobli, M., O'Carroll, A., Chauvin, B., Gambin, Y., Sierrecki, E., Landsberg, M. J., Stacey, K. J., Egelman, E. H., & Kobe, B. (2017). Structural basis of TIR-domain-assembly formation in MAL- and MyD88-dependent TLR4 signaling. *Nature Structural and Molecular Biology*, 24(9), 743–751. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3444>
- Ve, T., Williams, S. J., & Kobe, B. (2015). Structure and function of Toll/interleukin-1 receptor/resistance protein (TIR) domains. *Apoptosis*, 20(2), 250–261. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-1064-2>
- Vishwanath, S., Sukhwai, A., Sowdhamini, R., & Srinivasan, N. (2017). Specificity and stability of transient protein–protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 44, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.12.010>
- Walter, M. R. (2020). The Role of Structure in the Biology of Interferon Signaling. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.606489>
- Wang, L., Yang, J. K., Kabaleeswaran, V., Rice, A. J., Cruz, A. C., Park, A. Y., Yin, Q., Damko, E., Jang, S. B., Raunser, S., Robinson, C. V., Siegel, R. M., Walz, T., & Wu, H. (2010). The Fas-FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(11), 1324–1329. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1920>
- Wan, L., Essuman, K., Anderson, R. G., Sasaki, Y., Monteiro, F., Chung, E. H., Nishimura, E. O., DiAntonio, A., Milbrandt, J., Dangl, J. L., & Nishimura, M. T. (2019). TIR domains of plant immune receptors are NAD⁺-cleaving enzymes that promote cell death. *Science*, 365(6455), 799–803. <https://doi.org/10.1126/science.aax1771>
- Weber, D. J., Gracon, A. S. A., Ripsch, M. S., Fisher, A. J., Cheon, B. M., Pandya, P. H., Vittal, R., Capitano, M. L., Kim, Y., Allette, Y. M., Riley, A. A., McCarthy, B. P., Territo, P. R., Hutchins, G. D., Broxmeyer, H. E., Sandusky, G. E., White, F. A., & Wilkes, D. S. (2014). The HMGB1-RAGE axis mediates traumatic brain injury-induced pulmonary dysfunction in lung transplantation. *Science Translational Medicine*, 6(254). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010588>
- Wein, T., & Sorek, R. (2022). Bacterial origins of human cell-autonomous innate immune mechanisms. *Nature Reviews Immunology*, 22(10), 629–638. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00705-4>

- Weischenfeldt, J., & Porse, B. (2008). Bone marrow-derived macrophages (BMM): Isolation and applications. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3(12). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5080>
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, SP., Choi, D., Hehl, R., & Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, 78(6), 1101–1115.
- Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J. L., & Tong, L. (2000). Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*, 408(6808), 111–115. doi: 10.1038/35040600
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., & Akira, S. (2003a). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5633), 640–643. <https://doi.org/10.1126/science.1087262>
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K., & Akira, S. (2002a). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*, 420(6913), 324–329. <https://doi.org/10.1038/nature01182>
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., & Akira, S. (2003b). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nature Immunology*, 4(11), 1144–1150. <https://doi.org/10.1038/ni986>
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., & Akira, S. (2002b). Cutting Edge: A Novel Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter That Preferentially Activates the IFN- β Promoter in the Toll-Like Receptor Signaling. *The Journal of Immunology*, 169(12), 6668–6672. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.12.6668>
- Yang G, Zhou Y, Liu X, Xu L, Cao Y, Manning RJ, Patterson CJ, Buhrlage SJ, Gray N, Tai YT, Anderson KC, Hunter ZR, Treon SP. (2013). A mutation in MYD88 (L265P) supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*, 122(7), 1222–32. doi: 10.1182/blood-2012-12-475111
- Zhou H., Coveney A.P., Wu M., Huang J., Blankson S., Zhao H., O’Leary D.P., Bai Z., Li Y., Redmond H.P., Wang J.H., & Wang J. (2019) Activation of both TLR and NOD signaling confers host innate immunity-mediated protection against microbial infection. *Front. Immunol.*, 9, 3082. doi: 10.3389/fimmu.2018.03082

- Лысакова Е.В., Рыбцов С.А., Тошаков В.Ю. (2025) Продукция провоспалительных цитокинов в ответ на стимуляцию адгезирующихся клеток донорской крови растворимым ЛПС и фагоцитируемыми бактериями. *Инфекция и иммунитет*, 15(1), 178–184. doi: 10.15789/2220-7619-PCP-17752
- Тошаков В.Ю. (2024) Пептидные блокаторы индуцированных взаимодействий сигнальных белков: текущее состояние и перспективы развития. *Биохимия*, 89(5), 755–771. doi: 10.31857/S0320972524050025
- Финкельштейн, А. В., & Птицын, О. Б. (2005). *Физика белка* (В. Я. Дубнова, Ed.; 3rd-е изд. ed.). Издательство “КДУ.”