

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК, ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК,
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК –
ОБОСОБЛЕННОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР «ПУЩИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

РЕЦЕПТОРЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

22–26 мая 2023 г.



СБОРНИК СТАТЕЙ

Том 1

Под редакцией
А.В. Бережнова, В.П. Зинченко

Пушино
2023

УДК 576.3
ББК 28.05
Р 45

Состав научного оргкомитета:
д.б.н., проф. *Зинченко В.П.* – председатель,
к.б.н. *Бережнов А.В.*, к.б.н. *Федотова Е.И.*,
чл.-корр. РАН, проф. *Колесников С.С.*

Локальный оргкомитет:
к.б.н. *Надеев А.Д.*, к.б.н. *Мальцева В.Н.*, к.б.н. *Теплов И.Ю.*,
к.б.н. *Гайдин С.Г.*, к.б.н. *Косенков А.М.*, *Ларюшкин Д.П.*, *Крицкая К.А.*

Р45 **Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 1.** /
Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко – Серпухов:
Типография Пятый Формат, 2023. – 381 с.

ISBN 978-5-6049994-1-7 (Т. 1)
ISBN 978-5-6049994-0-0

С 22 по 26 мая 2023 г. в г. Пущино проходила Международная конференция
«Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». В сборнике представлены тексты
152 статей по материалам докладов участников конференции.

В первый том вошли разделы:

- общие вопросы сигнализации;
- кальциевая сигнализация;
- сигнализация в мышечных клетках и нейронах;
- внеклеточные везикулы и межклеточная коммуникация;
- сигнализация с участием митохондрий. Биоэнергетика.

Второй том содержит разделы:

- сигнализация с участием ионных каналов и рецепторов;
- сигнализация в синапсе;
- сигнализация при апоптозе и в условиях стресса. Активные формы кислорода в системе внутриклеточной сигнализации;
- действие физиологически активных соединений. Фармакологические мишени внутриклеточной сигнализации;
- сигнализация в растительных клетках и у прокариот;
- особенности сигнализации в стволовых и опухолевых клетках;
- новые подходы и методы клеточных исследований.

УДК 576.3
ББК 28.05

ISBN 978-5-6049994-1-7 (Т. 1)
ISBN 978-5-6049994-0-0

© Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 2023

ЛИТЕРАТУРА

1. Hashizume H., Ushiki T., Abe K. // Arch. Histol. Cytol. 1995. 58: 457-64.
2. Carrow R., Calhoun M.L. // Anat. Rec. 1964. 150(3): 249-56.
3. Spach M.S., Barr R.C., Jewett P.H. // Am. J. Cardiol. 1972. 30(8): 844-54.
4. Cheung D.W. // J. Physiol. 1981. 314(1): 445-56.
5. Sugimura S., Kurita T., Kaitani K. et al. // Heart Vessels. 2016. 31(9): 1562-9.
6. Mansour M., Ruskin J., Keane D. // J. Cardiovasc. Electrophysiol. 2002. 13(12): 1292-5.
7. Iwasaki Y.K., Nishida K., Kato T., Nattel S. // Circulation. 2011. 124(20): 2264-74.
8. Arita M., Saeiki K., Tanoue M. et al. // Jpn. J. Physiol. 1967. 17(2): 158-73.
9. Maupoil V., Bronquard C., Freslon J.L. et al. // Br. J. Pharmacol. 2007. 150(7): 899-905.
10. Tsuneoka Y., Irie M., Tanaka Y. et al. // J. Pharmacol. Sci. 2017. 133(4): 195-202.
11. Tai C.T., Chiou C.W., Wen Z.C. et al. // J. Am. Coll. Cardiol. 2000. 36(3): 788-93.
12. Chen Y.J., Chen Y.C., Yeh H.I. et al. // Circulation. 2002. 105(22): 2679-85.
13. Gallego M., Alday A., Alonso H., Casis O. // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2014. 1838(2): 692-9.
14. Hibino H., Inanobe A., Furutani K. et al. // Physiol. Rev. 2010. 90(1): 291-366.

ВЛИЯНИЕ АНТИГЕНОВ МИКОБАКТЕРИЙ НА ОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ГРАНУЛОЦИТОВ

*Коровина М.О.^{1,2}, Филина Ю.В.¹, Сафронова В.Г.³,
Хаертынов К.С.², Габдулхакова А.Г.^{1,2}*

¹ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Казань, Россия

²КГМА – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России,
Казань, Россия

³ИБК РАН, Пушино, Россия

Введение. Нейтрофилы экспрессируют множество рецепторов для распознавания патогена и активации последующих реакций для уничтожения инфицирующего агента. К таким рецепторам относятся сцепленные с G-белком рецепторы формилированных пептидов, рецепторы фактора активации тромбоцитов, рецепторы компонента комплемента 5а и рецепторы хемокинов, которые регулируют миграцию и реализацию защитных функций клеток. Фагоцитоз зависит от активации Fc-рецепторов (FcR) и рецепторов комплемента, которые инициируют поглощение и уничтожение опсонизированных частиц, вирусов и бактерий. Рецепторы распознавания образов (PRRs), включая Toll-подобные рецепторы (TLRs), рецепторы лектина С-типа. (CLRs), рецепторы-мусорщики (SRs) и NOD-подобные рецепторы (NLRs) распознают структурно консервативные фрагменты микроорганизмов и

способствуют захвату частиц, а также активируют сигнальные каскады, регулирующие иммунные и воспалительные реакции [1-3].

Однако, в некоторых случаях нейтрофилы фагоцитируют, но не убивают бактерии и могут выступать в роли «тройного коня», экранируя бактерии от более эффективных защитных действий макрофагов [4,5]. Такое явление наблюдается при туберкулезе, который является одним из самых распространенных смертельных инфекционных заболеваний. Механизмы, за счет которых микобактерии ингибируют иммунные клетки, тесно связаны с модуляцией оксидазной функции клеток: продукция антиоксидантов, таких как KatG, позволяет обезвреживать активные формы кислорода (АФК), а комплекс белков SodA, DoxX и SseA, уменьшает окислительное повреждение, поддерживая тиоловый гомеостаз [6]. В то же время было обнаружено, что микобактериальная инфекция приводит к появлению в периферической крови больных туберкулезом популяции гранулоцитов низкой плотности, которые склонны к усиленной спонтанной продукции АФК и выбросу нуклеотидных внеклеточных ловушек [7]. Было высказано предположение, что микобактерии активируют гиперпродукцию АФК нейтрофилами, провоцируя некроз иммунных клеток, что способствует снижению противомикробной защиты [8].

Таким образом, остается не совсем ясным, каким образом микобактерии могут модулировать оксидазную активность нейтрофилов. Целью нашей работы была оценка влияния серологически активных антигенов лизатов микобактерии *M. bovis* на оксидазную активность нейтрофилов, вызванную различными стимулами.

Материалы и методы. Гранулоциты выделяли из костного мозга мышей-самцов линии BALB/c возрастом 8-12 недель и весом 20-25 г. Животные были получены из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пушино, Россия). Исследования на животных одобрены протоколами № 12306 (2006) и № 2019/5 (2011) ИБК РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН (Пушино, Россия). Выделение клеток из костного мозга мыши проводили методом центрифугирования в градиенте плотности перколла 55%, 62.5%, 78%, (v/v) при 10°C [9]. Жизнеспособность клеток определяли по окраске трипановым синим. Для экспериментов использовали выделенные клетки с жизнеспособностью и долей зрелых гранулоцитов не менее 95% (КМ-гранулоциты).

Клетки *M. bovis* Bovinus-8, штамм 700201 культивировали с использованием твердой среды Lowenstein-Jensen в течение 28-30 дней при 37°C, затем разрушали при помощи гомогенизатора FastPrep-24 с использованием Lysing MatrixB (MP Biomedicals). Осветленные гомогенаты разделяли с помощью электрофореза в 12.5% в ПААГ в денатурирующих условиях, затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану для проведения иммуноблота. Для определения серологической активности использовали гипериммунную сыворотку кролика из

коллекции ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань). Антигены 5 и 6 (2.8-3 кДа) являются синтетическими полипептидами, подобными пептидам *M. bovis*, и содержат иммуногенные эпитопы, свойственные патогенным штаммам.

Для измерения продукции АФК использовали метод люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) [9]. При оценке действия антигенов в пробы добавляли антиген или растворитель (контрольные образцы). Исходная концентрация антигенов, мг/мл: АГ1 – 0.083; АГ-2 – 0.08; АГ3 – 0.059; АГ4 – 0.23; АГ5 – 1.0; АГ6 – 1.0. Для стимуляции клеток использовали формилованный пептид fMLF (N-формил-L-метионил-L-лейцил-L-фенилаланин, 10^{-5} М), опсонизированный зимозан (ОЗ, 125 мкг/мл) и форбол-12-миристан-13-ацетат (РМА, 10^{-6} М). Измерения проводили в трёх технических повторах и не менее чем в трех биологических повторах.

Статистическая обработка результатов проведена с использованием ПО GraphPad Prism 8.0 (GraphPad software). Результаты представлены на графиках как среднее значение и стандартное отклонение.

Результаты. Взаимодействие с гипериммунной сывороткой кролика показало, что высокой серологической активностью обладают белковые фракции с молекулярной массой 10, 22, 24 и 40 кДа (АГ1-4, соответственно). Исследование оксидазной активности показало, что АГ 1-3 способны вызывать дозозависимую продукцию АФК КМ-гранулоцитами мыши, тогда как АГ4 и синтетические АГ5-6 не обладают способностью стимулировать оксидазную активность гранулоцитов (рис. 1).

Способность запускать респираторный ответ гранулоцитов присуща нескольким типам рецепторов: рецепторам формилованных пептидов FPR1/2, фрагментов комплимента C3aR/C5aR/CRs, фактора активации тромбоцитов PAFRs, пиримидиновым рецепторам P2Y2R, также генерацию АФК стимулирует фагоцитоз при активации FcR, CLR, SR и других. Мы полагаем, что мишенями исследуемых микобактериальных пептидов могут быть FPR, лектиновые и рецепторы-мусорщики, способные узнавать гликопротеины, а также TLR, распознающие патоген-ассоциированные образы.

Активация НАДФН-оксидазы гранулоцитов происходит при фосфорилировании субъединиц фермента протеинкиназой С (PKC) и их сборке на плазматической мембране; PKC является эффекторной молекулой при стимуляции как FPR, так и Fc-рецепторов [10,11]. При стимуляции FPR происходит G β γ /PLC β -зависимая активация PKC, тогда как при стимуляции FcR запускается путь Src/PI3K/PLC γ -зависимой активации PKC. Для оценки вклада указанных сигнальных путей в активацию НАДФН-оксидазы антигенами микобактерий мы использовали три стимула, два из которых, fMLF и ОЗ, запускают рецептор-опосредованную активацию оксидазной активности гранулоцитов через FPR и FcR, соответственно, и РМА, который напрямую активирует PKC.

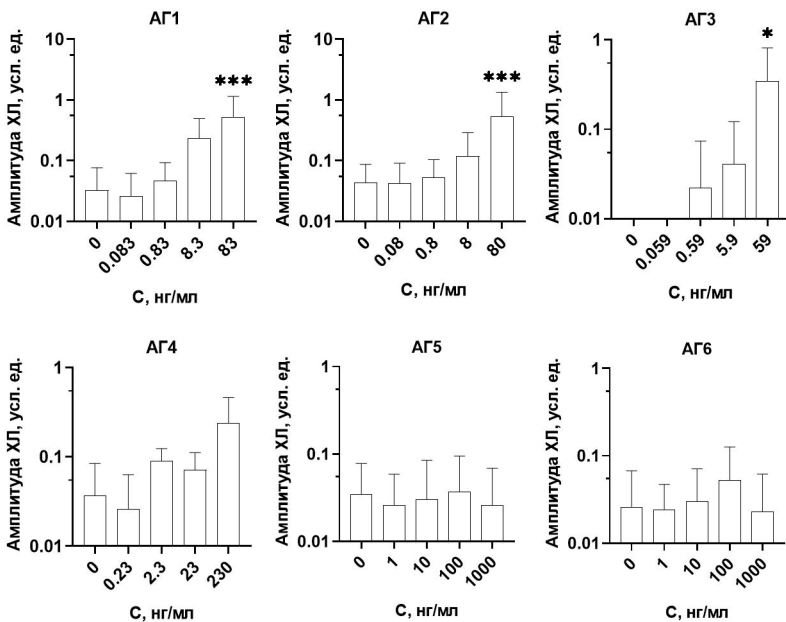


Рис. 1. Зависимость амплитуды ХЛ от концентрации исследуемых пептидных антигенов ($n = 5$; ось x – ХЛ, усл. ед., ось y – концентрация антигена, нг/мл; 0 – контроль, растворитель; * – $p \leq 0.05$; *** – $p \leq 0.001$, двухфакторный дисперсионный анализ и тест Даннета).

Было выявлено значительное ингибирование FPR- и FcR-вызванного респираторного ответа гранулоцитов, предобработанных АГ1 и АГ4 в концентрации 1/1000 от исходной (рис. 2, fMLF и ОЗ), в то же время предобработка АГ1 и АГ4 вызывала достоверное усиление ответа на РМА (рис. 2).

Учитывая, что данные белки сами активировали оксидазную активность гранулоцитов, подавление ответов на fMLF может свидетельствовать о том, что АГ1 и АГ4 могут связываться и активировать FPR и вызывать их десенситизацию. Подавление ОЗ-вызванной продукции АФК микобактериальными белками может быть обусловлено несколькими факторами: подавлением захвата опсонизированных частиц зимозана, подавлением созревания фагосом и подавлением сигнальных путей активации НАДФН-оксидазы. Усиление ответа на РМА после инкубации с АГ1 и АГ4 может происходить за счет дополнительной активации/фосфорилирования РКС и НАДФН-оксидазы.

Белки АГ2 и АГ3 усиливали продукцию АФК в ответ на fMLF, обеспечивая аддитивное или праймирующее действие, вероятно, за счет перекрестного взаимодействия с FPR-зависимыми сигнальными путями, но не с РКС. Подобного эффекта для этих антигенных белков при стимуляции FcR и РКС форболовым эфиром мы не обнаружили.

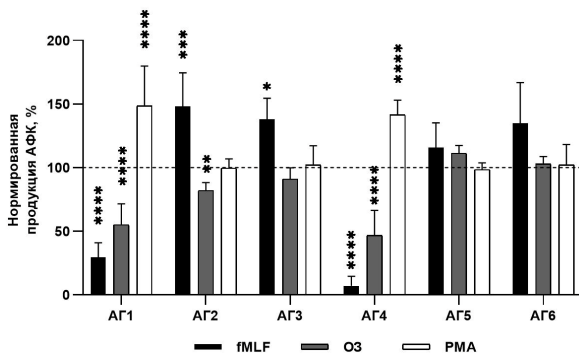


Рис. 2. Влияние пептидных антигенов на стимулированную продукцию АФК. Нормированная продукция рассчитана как отношение продукции АФК в образцах клеток, обработанных антигенами в течение 25 мин до добавления стимула, к продукции АФК в образцах клеток, не обработанных антигенами, принятой за 100% (контроль, пунктирная линия) (* – $p \leq 0.05$; ** – $p \leq 0.01$; *** – $p \leq 0.001$; **** – $p \leq 0.0001$, двухфакторный дисперсионный анализ и тест Даннета).

Выводы. Таким образом, серологически активные микобактериальные белки способны активировать продукцию АФК в КМ-гранулоцитах мыши. Наиболее вероятными кандидатами на взаимодействие с микобактериальными белками выступают рецепторы формилированных пептидов, поскольку эти белки способны модулировать ответ на агонисты FPR fMLF.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Futosi K., Fodor S., Mócsai A.* // *Int. Immunopharmacol.* 2013. 17(3): 638-50.
2. *Mayadas T.N., Cullere X., Lowell C.A.* // *Annu. Rev. Pathol.* 2014. 9: 181-218.
3. *Killick K.E., Ní Cheallaigh C., O'Farrelly C. et al.* // *Cell Microbiol.* 2013. 15(9): 1484-95.
4. *Lyadova I.V.* // *Mediators Inflamm.* 2017. 2017: 8619307.
5. *Almeida F.M., Ventura T.L., Amaral E.P. et al.* // *PLoS One.* 2017. 12(3): e0173715.
6. *Borkute R.R., Woelke S., Pei G., Dorhoi A.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. 22(9): 4801.
7. *Su R., Peng Y.P., Deng Z. et al.* // *Front. Microbiol.* 2019. 10: 1468.
8. *Corleis B., Korbelt D., Wilson R. et al.* // *Cell Microbiol.* 2012. 14(7): 1109-21.
9. *Filina Y.V., Tikhonova I.V., Gabdoulkhakova A.G. et al.* // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2023. 1869(12): 119356.
10. *Nguyen G.T., Green E.R., Mecsas J.* // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2017. 7: 373.