

Влияние вкДНК на экспрессию рецепторов семейства TLR в мезенхимных стволовых клетках человека

Ершова Е.С., Вейко Н.Н., Салимова Н.А., Каменева Л.В., Долгих О.А., Костюк С.В.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

Введение. Посредованная толл-подобными рецепторами (TLR) активация врожденного иммунного ответа варьирует в зависимости от типа клеток. TLR могут узнавать не только экзогенные патогенные молекулы (PAMP – pathogen-associated molecular patterns), но и молекулы эндогенной природы, появляющиеся при повреждении тканей, асептическом воспалении и дегенерации – DAMP. При определенных обстоятельствах эта реакция может быть неконтролируемой, что приводит к развитию тяжелого системного воспаления и сепсиса. TLR9 – единственный из TLR, который способен обнаруживать патогенные CpG-ДНК в эндолизосомных структурах. В составе внеклеточной ДНК (вкДНК) при патологии, при беременности и при действии повреждающих факторов накапливаются GC-богатые фрагменты рибосомной ДНК (рДНК), являющиеся лигандами TLR9.

Цель исследования: исследовать влияние разных по составу фрагментов вкДНК на экспрессию TLR9 и других TLR человека в клеточных культурах *in vitro*.

Методы. Исследование проводилось на гистологически различающихся культурах с разным пролиферативным потенциалом: мезенхимные стволовые клетки (N=13), HUVEC (N=7) и клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF7. Исследование экспрессии клетками поверхностных белков проводили методом проточной цитометрии. Для моделирования воздействия вкДНК на разные типы клеток были приготовлены модельные формы ДНК: геномная ДНК (гДНК) гидролизованная нуклеазой, окисленные формы гДНК и модельный GC-обогащенный фрагмент ДНК – CpG-богатый фрагмент транскрибируемой области рДНК. Уровень экспрессии генов TLR 1-10 оценивали методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. Установлено повышение экспрессии генов внутриклеточных эндоплазматических рецепторов TLR3, TLR7 и TLR8 в ответ на воздействие как GC-богатых, так и окисленных фрагментов вкДНК в разных типах клеток. Кроме того, в присутствии вкДНК возрастает экспрессия генов рецепторов клеточной поверхности TLR6 и, в меньшей степени, TLR1 и TLR5. При действии окисленных фрагментов возрастает экспрессия гена TLR4. Однако, повышение экспрессии генов семейства TLR возникает вторично после активации TLR9. Блокирование TLR9 ингибирует проведение сигнала и через остальные TLR.

Заключение. Наблюдаемое при воздействии вкДНК увеличение экспрессии рецепторов семейства TLR, помимо TLR9, может быть связано с вовлечением сети рецепторов TLR в регуляцию проведения сигнала через TLR9, как через взаимодействия между рецепторами TLR, так через другие сигнальные пути, связанные с распознаванием вкДНК ДНК-сенсорами.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, TLR.

Для цитирования: Ершова Е.С., Вейко Н.Н., Салимова Н.А., Каменева Л.В., Долгих О.А., Костюк С.В. Влияние вкДНК на экспрессию рецепторов семейства TLR в мезенхимных стволовых клетках человека. *Медицинская генетика* 2021; 20(11): 25-35.

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.11.25-35

Автор для корреспонденции: Ершова Елизавета Сергеевна, e-mail: es-ershova@rambler.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования России на выполнение НИР в 2021 году.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 10.11.2021.

The effect of cfDNA on the expression of TLR receptors in human mesenchymal stem cells

Ershova E.S., Veiko N.N., Salimova N.A., Kameneva L.V., Dolgih O.A., Kostyuk S.V.

Research Centre for Medical Genetics
1 Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation

Background. TLR-mediated activation of the innate immune response varies with cell type. TLRs can recognize not only exogenous pathogenic molecules (PAMP – pathogen-associated molecular patterns), but also endogenous molecules that appear during tissue damage, aseptic inflammation, and degeneration – DAMP. Under certain circumstances, this reaction may be uncontrollable, which leads to the development of severe systemic inflammation and sepsis. TLR9 is the only TLR that is capable of detecting pathogenic CpG DNA in endolysosomal structures. GC-rich rDNA fragments, which are TLR9 ligands, are accumulated in eDNA during pathology, pregnancy, or under the action of damaging factors.

Aim: to investigate the influence of cfDNA fragments of different composition on the expression of TLR9 and on the expression of other human TLRs in *in vitro* cultures.

Methods. The study was carried out on histologically different cultures with different proliferative potentials: mesenchymal stem cells (N = 13), HUVEC (N = 7), and MCF7 human breast adenocarcinoma cells. The expression of surface proteins by cells was studied by flow cytometry. To simulate the effect of eDNA on different types of cells, there were prepared model forms of DNA: genomic DNA (hydrolyzed by nuclease), oxidized forms of gDNA, and a model GC-enriched DNA fragment – CpG – a rich fragment of the transcribed region of rDNA. The expression level of TLR 1-10 genes was assessed by real-time PCR.

Results. We noticed an increase in the expression of intracellular endoplasmic receptors TLR3, TLR7 and TLR8 genes in response to the action of both GC-rich and oxidized cfDNA fragments in different types of cells. In addition, the presence of cfDNA increases the expression of cell surface receptors TLR6 genes, and, to a lesser extent, TLR1 and TLR5. Under the action of oxidized fragments, the expression of the TLR4 gene increases. However, an increase in the expression of TLR family genes occurs secondarily after TLR9 activation. Blocking TLR9 inhibits signal transduction through other TLRs.

Conclusions. Binding of An increase in the expression of receptors of the TLR family, except for TLR9, observed upon exposure to cfDNA, may be associated with the involvement of the TLR network in the regulation of signal transduction through TLR9, both through interactions between TLR receptors and through other signaling pathways associated with cfDNA recognition by DNA sensors.

Keywords: cell free DNA, TLR.

For citation: Ershova E.S., Veiko N.N., Salimova N.A., Kameneva L.V., Dolgih O.A., Kostyuk S.V. The effect of cfDNA on the expression of TLR receptors in human mesenchymal stem cells. *Medicinskaya genetika [Medical genetics]* 2021; 20(11): 25-35. (In Russ.)

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.11.25-35

Corresponding author: Elizaveta S. Ershova, e-mail: es-ershova@rambler.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 10.11.2021.

Введение

Фрагменты ДНК, циркулирующие вне клеток, называют внеклеточной ДНК (вкДНК), экстрацеллюлярной ДНК, внехромосомной ДНК, ДНК плазмы, ДНК сыворотки, в англоязычной литературе – cell-free DNA, circulating DNA, CNAPS [1]. Погибшие клетки являются основным источником вкДНК [2,3]. В течение длительного времени вкДНК активно изучается как пассивный маркер клеточной гибели при различных внешних повреждающих воздействиях, таких как облучение, заболевания, либо как объект неинвазивной диагностики [4-6]. Относительно недавно появился иной подход к изучению вкДНК, в рамках которого она рассматривается в качестве сигнальной молекулы, обладающей биологической активностью, независимо от ее нуклеотидной последовательности [7-8]. Обнаружено, что при хронической патологии в составе вкДНК накапливаются ГЦ-богатые последовательности рибосомного повтора, которые за счет высокого содержания ГЦ подвержены окислению, в основном, путем образования 8-оксогуанозина (8-оксо-dG), а окисленная вкДНК оказывает более сильное сигнальное воздействие [7,10,11].

Биологический смысл сигнального воздействия циркулирующей вкДНК связан с ее способностью передавать сигнал о наличии инфекции, травмы или иного неблагоприятного воздействия, вызывающего окислительный стресс и клеточную гибель [12]. Наиболее изученными рецепторами к вкДНК являются цитозольные AIM2, TLR9,

RIG-1, DAI ДНК-сенсоры [13–17]. Активация TLR9 вызывает воспалительный ответ, который включает в себя транслокацию транскрипционного фактора NF-κB из цитоплазмы в ядро с последующей активацией транскрипции генов-мишеней NF-κB [18–20].

Белки семейства толл-подобных рецепторов (TLR) играют важную роль в координации врожденного и приобретенного ответа иммунной системы [21]. TLR могут узнавать не только экзогенные патогенные молекулы (PAMP – pathogen-associated molecular patterns), но и молекулы эндогенной природы, появляющиеся при повреждении тканей, асептическом воспалении и дегенерации – DAMP (damage-associated molecular patterns) [22, 23].

До настоящего времени у человека идентифицировано 10 подтипов TLR [TLR (1–10)], разделенных на два подсемейства в соответствии с их локализацией: TLR на клеточной поверхности (1, 2, 4–6), экспрессируемые на поверхности клетки, и внутриклеточные TLR (3, 7–10), локализованные в эндосомном компартменте [24,25]. Лигандами TLR являются липопroteины, липиды и нуклеиновые кислоты [26]. Показано, что способность определенных TLR к гетеродимеризации расширяет диапазон разнообразия патогенов [27].

DAMP взаимодействуют с TLR как эндогенные лиганды и инициируют передачу сигнала, вызывая воспалительные реакции. Структурные исследования выявили множество молекулярных механизмов, с помощью

которых TLR опознают нуклеиновые кислоты. Двухцепочечная РНК и одноцепочечная ДНК, которые включают неметилированные мотивы цитозин-фосфат-гуанина (CpG), напрямую связываются с TLR3 и TLR9 соответственно, а TLR7 и TLR8 связываются с нуклеозидами и олигорибонуклеотидами, полученными из РНК [28]. Чрезмерная активация НК-чувствительных TLR приводит к прогрессированию различных воспалительных заболеваний, включая системную красную волчанку, сердечную недостаточность, артрит [29]. НК-чувствительные TLR являются мишенями для терапевтического вмешательства при этих заболеваниях.

TLR9 – единственный из семейства TLR, который способен обнаруживать патогенные CpG-ДНК в эндолизосомных структурах. К эндогенным лигандам TLR9 относятся фрагменты вкДНК ядер погибших в процессе апоптоза и некроза клеток, митохондриальная вкДНК [24, 26–28]. Анализ природы лигандов белков TLR позволяет сделать вывод, что GC- и CpG-богатые фрагменты вкДНК, которые накапливаются в биожидкости человека в норме и, особенно, при патологии, могут узнаваться белком TLR9 [30].

Экспрессия TLR9 была обнаружена в клетках многих тканей: лейкоцитах, дендритных клетках, клетках эндотелия, кардиомиоцитах, нейронах, клетках бронхиального эпителия, кератиноцитах, адипоцитах, в стволовых клетках, фибробластах, гепатоцитах [24, 25, 31–34].

В данной работе мы исследовали влияние разных по составу фрагментов вкДНК на экспрессию TLR9 и на экспрессию других TLR человека в клетках, культивируемых *in vitro*.

Методы

Характеристика культивируемых клеток

Различные аспекты биологического действия вкДНК исследовались на гистологически различающихся культивируемых клетках с разным пролиферативным потенциалом.

Недифференцированные клетки

В работе использованы мезенхимные стволовые клетки (МСК) из коллекции клеточных культур ФГБНУ «МГНЦ». (N=13), полученные из различных источников и охарактеризованные по поверхностным маркерам (таблица 1). Материал для выделения МСК – нормальная жировая ткань операционного материала больных с аденокарциномой молочной железы и подкожная жировая ткань.

Исследование экспрессии клетками поверхностных белков проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием соответствующих антител на приборе CyFlow (PARTEC, Германия). Было показано, что на поверхности всех МСК присутствуют молекулы главного комплекса гистосовместимости HLA-ABC+, молекулы адгезии CD44+, CD54 (low), CD90+, CD106+, интегрины CD29+, CD49b (low), ростовые факторы CD105 (low), но отсутствуют маркеры гемопоэтических клеток CD34-, CD45-, HLA-DR- и маркер к CD117-. Полученный профиль характерен для МСК. Кроме того, клетки в присутствии соответствующего индуктора дифференцировались в адипоциты.

Дифференцированные клетки

Культуры эндотелиальных клеток пупочной вены человека – HUVEC (N=7), получены из 9 различных образцов вены пуповины (нормально протекающие беременности, благополучные роды, здоровые новорожденные). Материал для выделения HUVEC предоставлен кафедрой акушерства и гинекологии РГМУ им. Пирогова. Клетки HUVEC охарактеризованы по маркеру CD31+.

Раковые клетки

Клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF7 получены из коллекции клеточных культур ФГБНУ «МГНЦ» РАМН. На поверхности клеток MCF7 присутствовали характерные молекулы эстрогенового рецептора (ER+) [35].

Таблица 1

Характеристика МСК, используемых в работе, по поверхностным маркерам

N	Клетки	Источник	Поверхностные маркеры
1	МСК ЖТ (N=9)	Жировая ткань молочных желез	CD34-, CD45-, HLA-ABC+, HLA-DR-, CD44+, CD29+, CD49b low, CD54 low, CD90+, CD106-, CD105+, CD117-
2	МСК (hMADs) (N=4)	Жировая ткань	CD34-, CD15-, HLA-ABC low, HLA-DR-, CD44+, CD13+, CD49b+, CD133-, CD90+, CD105+, CD117-

Характеристика образцов вкДНК и модельных фрагментов

Модельные фрагменты ДНК

Окисленные формы ДНК. Поскольку вкДНК при патологии и опасных для генома воздействиях содержит повышенное количество окисленных оснований, для исследования действия на разные типы клеток окисленных образцов ДНК были *in vitro* приготовлены модельные окисленные формы ДНК. Использование в эксперименте модельной гДНКокси, окисленной H_2O_2 *in vitro* исключает действие других возможных факторов, влияющих на свойства вкДНК, таких, как изменение уровня метилирования или изменение содержания различных последовательностей.

Условия окисления гДНК выбирали таким образом, чтобы уровень маркера окисления 8-оксо-dG в окисленной гДНКокси примерно соответствовал реально встречающемуся содержанию 8-оксо-dG во вкДНК при заболеваниях, которые сопровождаются окислительным стрессом. Пробы окисленной ДНК для эксперимента были приготовлены комбинированной обработкой образца гДНК 300mM H_2O_2 и ультрафиолетом при длине волны $\lambda = 312$ нанометров, что способствует интенсивной деградации H_2O_2 и продукции свободных радикалов (гДНКокси). Мы проанализировали методом масс-спектрометрии (ESI-MS/MS) содержание 8-оксо-dG во вкДНК плазмы больных раком молочной железы и острым инфарктом миокарда. На 10^6 нуклеозидов во вкДНК приходится 2100 8-оксо-dG. В интактной гДНК содержание 8-оксигуанозина было ниже пороговой чувствительности анализа, которая составляла $0,1(8\text{-оксо-dG})/10^6$ нуклеозидов [11].

ГЦ-богатые модельные фрагменты, лиганды и ингибиторы TLR9. Мы определили, что в составе вкДНК при патологии, при беременности и при действии повреждающих факторов накапливаются ГЦ-богатые фрагменты рДНК. Были сконструированы модельные фрагменты – плазмиды, содержащие в качестве вставок фрагменты рДНК.

В качестве модельной ГЦ–ДНК использовали CpG-богатый фрагмент транскрибируемой области рДНК (участок от 515 до 5321 в соответствии с HSU13369, GeneBank), встроенный в вектор pBR322 (п(рДНК)), длина последовательности 9504 п.н. Модельные образцы ДНК подвергали одинаковой дополнительной очистке от липополисахаридов: последовательно проводили обработку тритоном X-114 и гельфильтрацию на носителе HW-85.

Компьютерный анализ нуклеотидного состава п(рДНК) выявил в составе рДНК наличие немети-

рованных CpG-последовательностей – участков связывания с рецептором семейства TLR – TLR9. С целью нивелировать эффекты, которые могут быть вызваны действием белков и других биополимеров, способных связываться с нуклеиновыми кислотами, все образцы ДНК были депротеинизированы, а образцы плазмидной ДНК дополнительно очищены от липополисахаридов.

гДНК была гидролизована ДНКазой 1 до размера фрагментов, аналогичных тем, которые присутствуют в образце гДНКокси (от 0,2 до 15 т.п.н.). В работе проведено дополнительное исследование влияния длины фрагментов на активацию рецепторов клеток. Для этого п(рДНК), имеющую размер 10000 п.н. обработали рестриктазами RsaI и MspI. Не было выявлено различий в действии на клетки коротких и длинных фрагментов. Видимо, вкДНК в среде культивирования расщепляется нуклеазами до коротких фрагментов, и нет необходимости в дополнительном гидролизе добавляемых фрагментов.

Уровень экспрессии генов

Уровень экспрессии генов *TLR9, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR10*, оценивали методом ПЦР в реальном времени.

После воздействия на клетки фрагментов вкДНК из клеток выделяли РНК с использованием наборов YellowSolve («Клоноген», Россия) или реагента Trizol («Invitrogen») согласно прилагаемой методике (http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf) с последующей фенол-хлороформной экстракцией и осаждением хлороформом и изоамиловым спиртом (49:1). Концентрацию РНК определяли с помощью красителя Quant-iT RiboGreen RNA reagent («MoViTec», Германия) на планшетном ридере («EnSpire equipment», Финляндия), $\lambda_{\text{возб}} = 487$ нм, $\lambda_{\text{флу}} = 524$ нм. Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью реактивов фирмы «Силекс» (Россия) согласно стандартной методике.

ПЦР проводили с использованием соответствующих праймеров («Синтол») и интеркалирующего красителя SybrGreen на приборе StepOnePlus («Applied Biosystems», США). Праймеры, использованные в работе (записаны в одинаковом порядке (F;R)):

TBP (F: 5'-GCCCGAAACGCCGAATAT-3'; R: 5'-CCGTGGTTCGTGGCTCTCT-3');

TLR9 (TGAAGACTTCAGGCCCAACTG; TGCACGGTCACCAGGTTGT);

TLR2 (GGCCAGCAAATTACCTGTGTG; AGGCGGACATCCTGAACCT);

TLR1 (ATTTCAAACGTGAAGCTACAGGG; CCGAACACATCGCTGACAACCT);

TLR5 (TGCCTTGAAGCCTTCAGTTATG;
ССААССАССАССАТГАТГАГ);

TLR7 (TTACCTGGATGGAAACCAGCTACT;
TCAAGGCTGAGAAGCTGTAAGCTAV

TLR3 (AAGAGTTTTCTCCAGGGTGTTTT;
CAGATCCGAATGCTTGTGTTTG);

TLR6 (GAAGAAGAACAACCCTTTAGGATAGC;
AGGCAAACAATGGAAGCTT);

TLR10 (GATTTACTCTGGGACGACCTTTT;
GTCAAGATAAGCCTTACCACCA);

TLR4 (ACCTGAGCTTTAATCCCCTGA;
GGCTCTGATATGCCCATCTT);

TLR8 (CCAGAACGGAAATCCCGGTAT;
GGGTATTTGGGGTAAGCTGGTTG);

Состав реакционной ПЦР-смеси в объеме 25 мкл: 2,5 мкл ПЦР буфера (700 ммоль/л Tris-HCl, pH 8,6; 166 ммоль/л сульфата аммония, 35 ммоль/л MgCl₂), 2 мкл 1,5 ммоль/л раствора dNTP; по 1 мкл 30 пкмоль/л раствора праймеров, кДНК. Условия ПЦР подбирались индивидуально для каждой пары праймеров. Стандартные для большинства праймеров условия: после денатурации (95°C, 4 мин) проводили 40 циклов амплификации в режиме 94°C – 20 сек, 56-62°C – 30 сек, 72°C – 30 сек. Затем – 72°C в течение 5 мин. Реакцию ПЦР проводили в приборе StepOnePlus («Applied Biosystems», США).

Уровень экспрессии генов анализировали в нескольких независимых экспериментах на клетках от разных доноров, обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения прибора; ошибка составляла 2%.

Результаты и обсуждение

Нами было показано, что МСК, независимо от происхождения, экспрессируют все рецепторы TLR, уровень экспрессии генов *TLR1-10* сопоставим с уровнем экспрессии гена *TBP* (количество РНК *TLR110* составляет (0,5 – 4)× количества мРНК *TBP*), что согласуется с литературными данными [36]. TLR 1, 2, 4, 5, 6 располагаются на поверхности клеток, TLR 3, 7, 8, и 9 локализованы в эндосомах, их лигандами служат нуклеиновые кислоты [25,28].

При исследовании влияния окисленных и ГЦ-обогащенных фрагментов вкДНК на экспрессию генов рецепторов TLR, показано, что в присутствии ГЦ-богатой п(рДНК) и окисленных фрагментов (гДНКокси и п(рДНК)окси) через 24 часа в МСК увеличивается экспрессия генов не только TLR9, но и других TLR.

При действии неокисленных ГЦ-богатых фрагментов на МСК через 24 часа в клетках возрастает коли-

чество РНК генов внутриклеточных рецепторов *TLR3* и *TLR7*, а также генов *TLR5*, *TLR6* и *TLR1* трансмембранных рецепторов клеточной поверхности (рис. 1А). При действии окисленных фрагментов вкДНК увеличивается экспрессия генов эндосомальных TLR3, TLR7 и TLR8 и поверхностных TLR4 и TLR6 (рис. 1А). Вероятно, вкДНК стимулирует не только TLR9, но и другие рецепторы семейства TLR. Показано, что существует перекрестная активация TLR-рецепторов. Сложные сети взаимодействий внутриклеточных рецепторов могут модулировать проведение сигнала вкДНК через TLR9-сигнальный путь, как усиливая, так и ингибируя сигнал. Повышение экспрессии генов TLR, локализованных на поверхности клетки, может быть связано с передачей сигнала от вкДНК с поверхности клетки для инициации процесса перемещения TLR9 к эндосомам из эндоплазматического ретикулума. Так в литературе описано участие TLR4 в проведении сигнала от комплекса вкДНК-НМGB1 [37].

Была исследована динамика роста экспрессии генов внутриклеточных рецепторов TLR3, TLR7 и TLR8 при добавлении ГЦ-богатых и окисленных фрагментов (рис. 1Б). В первые 3–4 часа после добавления в среду культивирования МСК ГЦ-богатых и окисленных фрагментов возрастает экспрессия генов *TLR3* и *TLR7* (и *TLR8* при добавлении ДНКокси), достигающая максимальных значений к 24 часам (рис. 1Б). Через трое суток после начала воздействия любой вкДНК экспрессия генов *TLR* снижалась (рис. 1Б). Поскольку увеличение количества мРНК *TLR3*, *TLR7* и *TLR5* происходило позже, чем увеличение экспрессии гена *TLR9*, мы полагаем, что активация транскрипции других, не TLR9, рецепторов носит вторичный характер и запускается активацией общих адаптерных молекул TLR-сигнальных путей.

Для проверки этого предположения мы блокировали проведение сигнала через TLR9 с помощью ингибиторных ОДН (инг-ОДН) и хлорохина. И инг-ОДН, и хлорохин блокировали увеличение экспрессии генов внутриклеточных рецепторов TLR3, 7 и 9 и рецепторов клеточной поверхности (рис. 1В, Г). Только у гена *TLR1* на фоне блокаторов наблюдалась остаточная экспрессия (не более, чем в 1,4 раза превышающая контрольные значения). Полученный результат свидетельствует о вторичном повышении экспрессии генов *TLR3*, *TLR7* и *TLR8* и генов рецепторов TLR клеточной поверхности по отношению к *TLR9*. Однако, при наличии сайтов связывания CpG-ДНК у других внутриклеточных TLR [38] возможна активации транскрипции генов *TLR3*, *TLR7* и *TLR8* при непосредственном связывании ГЦ-богатых фрагментов вкДНК соответству-

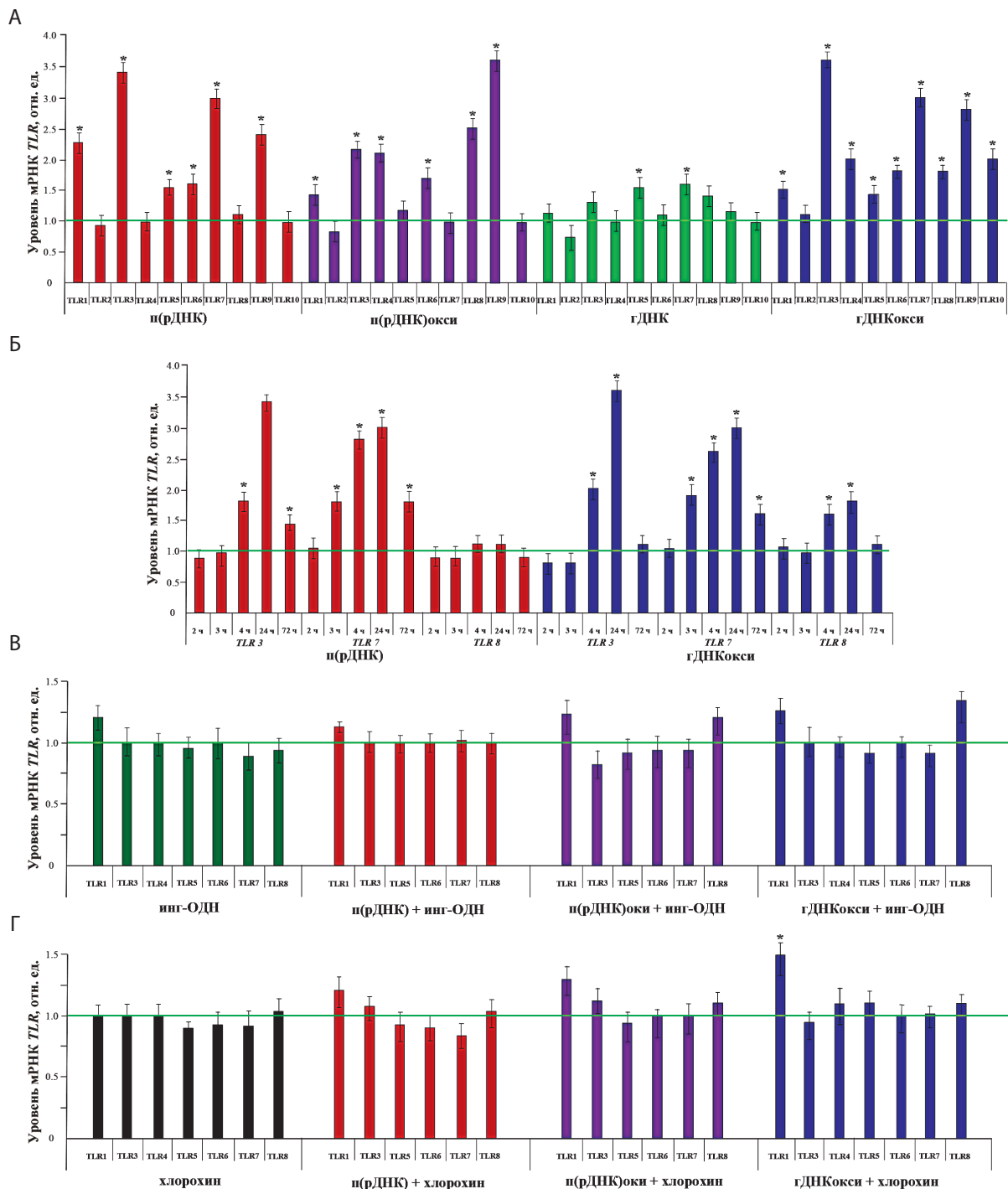


Рис. 1. А – Уровень экспрессии генов *TLR1-10* при культивировании МСК в присутствии неокисленных и окисленных фрагментов вкДНК (концентрация добавляемых фрагментов 50 нг/мл, время воздействия 24 часа). Б – Динамика изменения уровня экспрессии генов внутриклеточных рецепторов *TLR3*, *TLR7* и *TLR8* во времени при добавлении ГЦ-богатой п(рДНК) и окисленных фрагментов ДНКокси (концентрация добавляемых фрагментов 50 нг/мл), метод ПЦР в реальном времени. Уровень экспрессии TLR в МСК через 24 часа после введения в среду культивирования неокисленных и окисленных фрагментов вкДНК в концентрации 50 нг/мл через 30 мин после добавления к МСК инг-ОДН (В) и хлорохина (Г). Приводятся средние значения и SD для трех/шести независимых экспериментов. Данные приведены относительно контроля – интактных клеток того же донора и нормализованы по TBP (контроль – на графиках горизонтальная линия $1,0 \pm 0,3$ отн.ед.). (*) – различия между указанными значениями и контролем статистически значимы ($p < 0,05$).

ющими рецепторами. Возможно, наблюдаемый нами эффект связан с регуляторным воздействием вкДНК на клетки и вовлечение сети рецепторов TLR в регуляцию проведения сигнала через TLR9 – один из путей реализации регулирующего действия вкДНК.

Аналогичное действие фрагменты вкДНК оказывали на экспрессию генов внутриклеточных рецепторов TLR в HUVEC. Неокисленные ГЦ-богатые фрагменты п(рДНК) и окисленные фрагменты гДНКокси че-

рез 24 часа стимулировали транскрипцию генов *TLR3* и *TLR7*, но в меньшей степени, чем в МСК (рис. 2А). Окисленные образцы, кроме того, стимулировали повышение экспрессии гена *TLR8*. Однако, в отличие от МСК, в HUVEC статистически значимо не повышалась экспрессия генов TLR, расположенных на клеточной поверхности.

В культуре раковых клеток MCF7 фрагменты вкДНК независимо от нуклеотидного состава и сте-

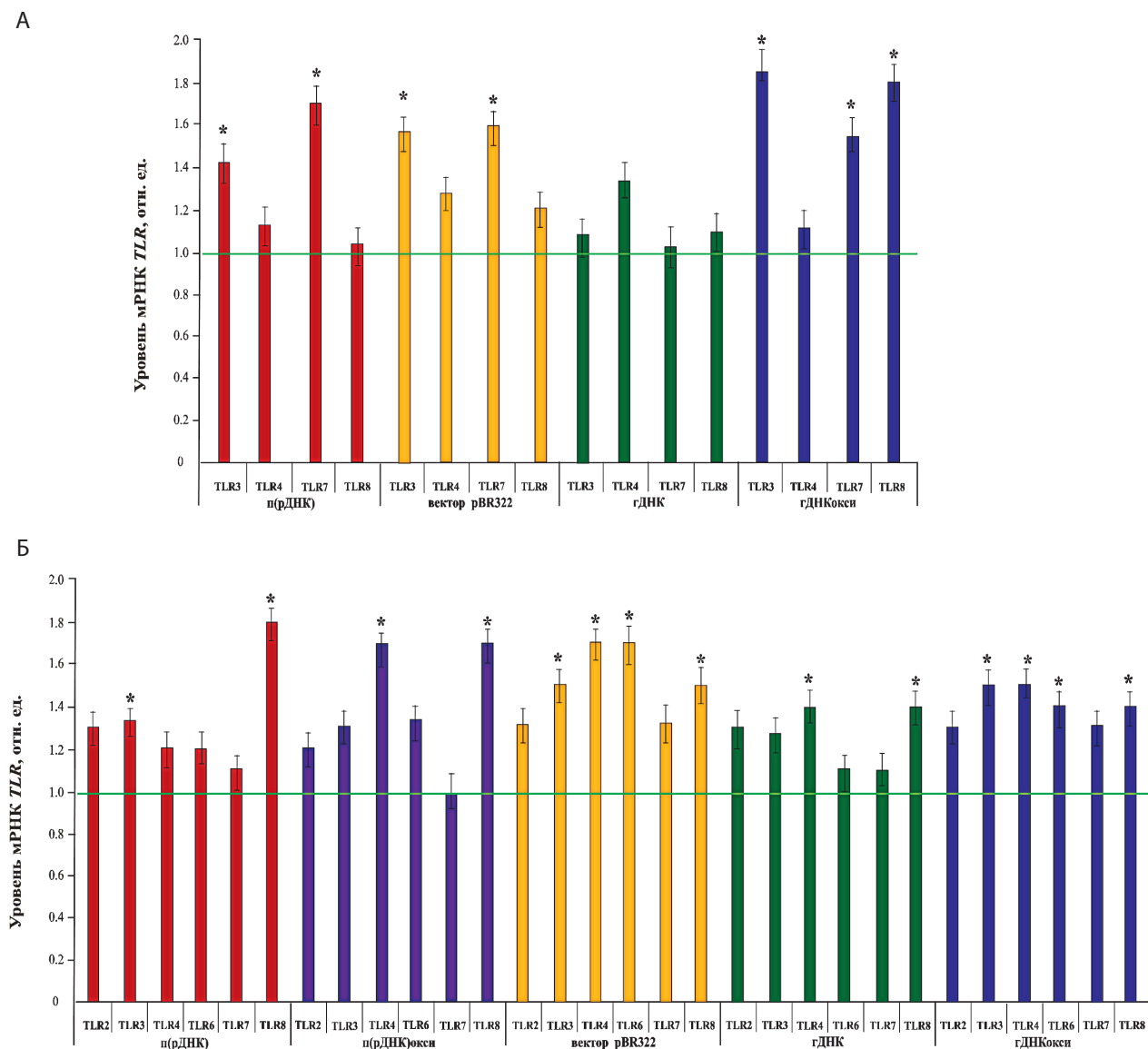


Рис. 2. А – Уровень экспрессии генов *TLR3*, *7*, *8* и *9* в HUVEC и (Б) – генов *TLR 2-4* и *TLR 6-8* в MCF7 через 24 часа после добавления неокисленных ГЦ-богатых и окисленных фрагментов вкДНК в концентрации 50 нг/мл. Данные приведены относительно контроля – необработанных клеток того же донора и нормализованы по гену *GAPDH* (для HUVEC) и по гену *TBP* (для MCF7). Контроль – на графиках горизонтальная линия $1,0 \pm 0,2$ отн.ед. Приведены средние значения для 2-х доноров HUVEC для 3-х экспериментов. (*) – различия между указанными значениями и контролем статистически значимы ($p < 0,05$).

пени окисления стимулировали экспрессию генов внутриклеточных рецепторов TLR8 и TLR3 в 1,3–1,8 раза через 24 часа после начала воздействия (рис. 2). Окисленные фрагменты индуцировали повышение экспрессии гена мембранного рецептора клеточной поверхности *TLR4*, и, в меньшей степени, *TLR2* и *TLR6* (только в 1,2–1,7 раз), ГЦ-богатые неокисленные фрагменты существенного влияния на транскрипцию поверхностных TLR не оказывали.

Таким образом, мы наблюдали повышение экспрессии генов внутриклеточных эндоплазматических рецепторов TLR3, TLR7 и TLR8 в ответ на воздействие как ГЦ-богатых, так и окисленных фрагментов вкДНК в разных типах клеток. Кроме того, в присутствии вкДНК возрастает экспрессия генов рецепторов клеточной поверхности TLR6 и, в меньшей степени, TLR1 и TLR5. При действии окисленных фрагментов возрастает экспрессия гена *TLR4*. Однако, повышение экспрессии генов рецепторов семейства TLR возникает вторично после активации TLR9. Блокирование TLR9 ингибирует проведение сигнала и через остальные TLR.

Связывание вкДНК с рецептором запускает каскад активированных молекул сигнальных путей, которые инициируют переход транскрипционных факторов в ядро клетки и активацию генов-мишеней этих сигнальных путей.

Отмечается синергизм действия TLR, как внутриклеточных рецепторов между собой, так и внутриклеточных, расположенных на эндосоме, с рецепторами, расположенными на мембране клеток. TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9, расположенные внутриклеточно на эндосомах, эволюционно консервативны и высоко гомологичны, между ними обнаружены кооперативные взаимодействия, приводящие к модулированию TLR-сигнализации [38]. Структурно TLR содержат уникальную повторяющуюся последовательность, отвечающую за связывание с лигандом – LRR ($xLxxLxLxx[N/L]x+xx+xxxxFxxLx$, где x – любая аминокислота, а $+$ – гидрофобная аминокислота) [38]. Инсерции в позиции 10 LRR в TLR 2, 5 и 8 создают потенциальные места связывания CpG-ДНК – лиганда TLR9 [38]. Инсерция в позиции 8 LRR обеспечивает связывание CpG-ДНК с помощью транскрипционного активатора, названного CpG-связывающим белком [38]. Предполагается, что активация различных TLR лигандами TLR9 может промотировать TLR9-сигнальный путь и способствовать более эффективному ответу клеток на присутствие метилированных CpG-мотивов [38]. Однако показано, что рецепторы TLR7 и TLR8 могут не только усиливать активацию TLR9 за счет перекрестной активации пересекающихся сигнальных пу-

тей, но и ингибировать TLR9-сигнальный путь [39]. Так, TLR8 может ингибировать TLR7 и TLR9, в свою очередь TLR9 ингибирует TLR7 [39]. Эти ингибирующие взаимодействия являются результатом прямого физического или косвенного взаимодействия между TLR [39].

Явления перекрестного ингибирования и активации рецепторов TLR активно изучаются и обобщаются [40–43]. Неясен механизм взаимодействия TLR в условиях патогенной инфекции, однако, высказываются ряд предположений о молекулярных механизмах, лежащих в основе кооперации TLR [40]. Активация разных TLR на лиганд, преимущественно связываемый одним типом TLR, может быть связана с формированием компетентного транскрипционного регуляторного комплекса, который требует взаимодействия факторов транскрипции, активируемых различными сигнальными путями в нужный момент времени [40]. В этой модели транскрипция данного гена усиливается синергически, вероятно, за счет совместного связывания факторов транскрипции с его промотором и формирования трехмерной структуры, подходящей для набора кофакторов и комплекса ремоделирования хроматина. Одним из примеров такой модели является активация человеческого IFN β . Возможно, что активация нескольких TLR индуцирует соответствующий набор факторов транскрипции, которые усиливают транскрипцию цитокинов. Действительно, показано, что TLR3 и TLR7 активируют различные наборы факторов транскрипции, необходимые для максимальной экспрессии цитокинов [44]. Показано, что сигнальная ось TLR7-MyD88 активирует JunB и cEBP β , тогда как путь TLR3-TRIF активирует IRF1; JunB, cEBP β и IRF1 необходимы для экспрессии цитокинов, и одновременная активация обоих путей – TLR7-MyD88 и TLR3-TRIF – синхронизирует и поддерживает активацию этих трех основных факторов транскрипции, приводя к синергии цитокинов [44]. Таким образом, TLR могут напрямую взаимодействовать друг с другом, активируя различные наборы факторов транскрипции, которые необходимы для экспрессии синергических уровней цитокинов.

Логично предположить, что TLR – не единственные рецепторы связывания вкДНК в клетках, и перекрестная активация разных типов TLR может быть вызвана более сложным взаимодействием активирующихся сигнальных путей [43]. Кроме того, показано, что NRF2- антиоксидантный сигнальный путь может координировать активацию TLR9 [42]. Однако несмотря на активные исследования в области регуляции активности TLR, до сих пор нет понимания молекулярного механизма регуляции экспрессии TLR на транс-

крипционном и посттранскрипционном уровнях, что необходимо для понимания ответа клеток на экзогенные и эндогенные лиганды, вызывающие воспалительный процесс и аутоиммунную реакцию, соответственно.

Наблюдаемый нами эффект может быть связан с регуляторным воздействием вкДНК на клетки и вовлечением сети рецепторов TLR в регуляцию проведения сигнала через TLR9, как через взаимодействия между рецепторами TLR, так и через активацию различных ДНК-сенсоров лигандами TLR9. Эти механизмы способствуют, с одной стороны, более эффективному ответу клеток на присутствие метилированных CpG-мотивов, а, с другой стороны, позволяют избежать гиперстимулирования TLR9 сигнального пути при состояниях с хронически повышенной вкДНК.

Литература

- Galeazzi M., Morozzi G., Piccini J. et al. Dosage and characterization of circulating DNA: present usage and possible applications in systemic autoimmune disorders. *Autoimmun Rev.* 2003 Jan;2(1):50-5. doi: 10.1016/s1568-9972(02)00101-5
- van der Vaart M., Pretorius P.J. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta.* 2008 Sep;395(1-2):186. doi: 10.1016/j.cca.2008.05.006.
- Lu Y., Zhu X., Liang G.X., et al. Apelin-APJ induces ICAM-1, VCAM-1 and MCP-1 expression via NF- κ B/JNK signal pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Amino Acids.* 2012 Nov;43(5):2125-36. doi: 10.1007/s00726-012-1298-7. Epub 2012 Apr 25. PMID: 22532031.
- Elshimali Y.I., Khaddour H., Sarkissyan M., et al. The clinical utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer patients. *Int J Mol Sci.* 2013 Sep 13;14(9):18925-58. doi: 10.3390/ijms140918925
- Forte V.A., Barrak D.K., Elhodaky M. et al. The potential for liquid biopsies in the precision medical treatment of breast cancer. *Cancer Biol Med.* 2016 Mar;13(1):19-40. doi: 10.28092/j.issn.2095-3941.2016.0007.
- Tamminga S., van Maarle M., Henneman L., et al. Maternal Plasma DNA and RNA Sequencing for Prenatal Testing. *Adv Clin Chem.* 2016;74:63-102. doi: 10.1016/bs.acc.2015.12.004.
- Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V., et al. Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:649747. doi: 10.1155/2013/649747.
- Glebova K., Veiko N., Kostyuk S., et al. Oxidized extracellular DNA as a stress signal that may modify response to anticancer therapy. *Cancer Lett.* 2015 Jan 1;356(1):22-33. doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.005.
- Korzeneva I.B., Kostyuk S.V., Ershova L.S., et al. Human circulating plasma DNA significantly decreases while lymphocyte DNA damage increases under chronic occupational exposure to low-dose gamma-neutron and tritium β -radiation. *Mutat Res.* 2015 Sep;779:1-15. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2015.05.004..
- Kostyuk S.V., Tabakov V.J., Chestkov V.V., et al. Oxidized DNA induces an adaptive response in human fibroblasts. *Mutat Res.* 2013 Jul-Aug;747-748:6-18. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.04.007.
- Loseva P., Kostyuk S., Malinovskaya E., et al.. Extracellular DNA oxidation stimulates activation of NRF2 and reduces the production of ROS in human mesenchymal stem cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2012 Jun;12 Suppl 1:S85-97. doi: 10.1517/14712598.2012.688948.
- Pisetsky D.S. The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP. *Clin Immunol.* 2012 Jul;144(1):32-40. doi: 10.1016/j.clim.2012.04.006.
- Chiu Y.H., Macmillan J.B., Chen Z.J. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell.* 2009 Aug 7;138(3):576-91. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.015.
- Li H., Wang J., Wang J., et al. Structural mechanism of DNA recognition by the p202 HINA domain: insights into the inhibition of Aim2-mediated inflammatory signalling. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 2014 Jan;70(Pt 1):21-9. doi: 10.1107/S2053230X1303135X.
- Triantafilou K., Eryilmazlar D., Triantafilou M. Herpes simplex virus 2-induced activation in vaginal cells involves Toll-like receptors 2 and 9 and DNA sensors DAI and IFI16. *Am J Obstet Gynecol.* 2014 Feb;210(2):122.e1-122.e10. doi: 10.1016/j.ajog.2013.09.034.
- Keating S.E., Baran M., Bowie A.G. Cytosolic DNA sensors regulating type I interferon induction. *Trends Immunol.* 2011 Dec;32(12):574-81. doi: 10.1016/j.it.2011.08.004.
- Goulopoulou S., Matsumoto T., Bomfim G.F., et al. Toll-like receptor 9 activation: a novel mechanism linking placenta-derived mitochondrial DNA and vascular dysfunction in pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond).* 2012 Oct;123(7):429-35. doi: 10.1042/CS20120130.
- Kostjuk S., Loseva P., Chvartatskaya O., et al. Extracellular GC-rich DNA activates TLR9- and NF- κ B-dependent signaling pathways in human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAMSCs). *Expert Opin Biol Ther.* 2012 Jun;12 Suppl 1:S99-111. doi: 10.1517/14712598.2012.690028.
- Ghosh S., Dass J.F.P. Study of pathway cross-talk interactions with NF- κ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review. *Gene.* 2016 Jun 10;584(1):97-109. doi: 10.1016/j.gene.2016.03.008.
- Bliksøen M., Mariero L.H., Torp M.K., et al.. Extracellular mtDNA activates NF- κ B via toll-like receptor 9 and induces cell death in cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol.* 2016 Jul;111(4):42. doi: 10.1007/s00395-016-0553-6.
- Holm C.K., Paludan S.R., Fitzgerald K.A. DNA recognition in immunity and disease. *Curr Opin Immunol.* 2013 Feb;25(1):13-8. doi: 10.1016/j.coi.2012.12.006.
- Takagi M. Toll-like receptor--a potent driving force behind rheumatoid arthritis. *J Clin Exp Hematop.* 2011;51(2):77-92. doi: 10.3960/jslrt.51.77.
- Lee C.C., Avalos A.M., Ploegh H.L. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol.* 2012 Feb 3;12(3):168-79. doi: 10.1038/nri3151.
- Goulopoulou S., McCarthy C.G., Webb R.C. Toll-like Receptors in the Vascular System: Sensing the Dangers Within. *Pharmacol Rev.* 2016 Jan;68(1):142-67. doi: 10.1124/pr.114.010090.
- Lazaridis A., Gavriilaki E., Douma S., Gkaliagkousi E. Toll-Like Receptors in the Pathogenesis of Essential Hypertension. A Forthcoming Immune-Driven Theory in Full Effect. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 26;22(7):3451. doi: 10.3390/ijms22073451.
- Fitzgerald K.A., Kagan J.C. Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell* (2020) 180(6):1044–66. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.041
- Behzadi P., Garcia-Perdomo H.A., Karpiński T.M. Toll-Like Receptors: General Molecular and Structural Biology. *J Immunol Res.* 2021 May 29; 2021:9914854. doi: 10.1155/2021/9914854.
- Miyake K., Shibata T., Ohto U., et al. Mechanisms controlling nucleic acid-sensing Toll-like receptors. *Int Immunol.* 2018 Mar 8; 30(2):43-51. doi: 10.1093/intimm/dxy016.
- Jung J.Y., Kim J.W., Suh C.H., et al. Roles of Interactions Between Toll-Like Receptors and Their Endogenous Ligands in the Patho-

- genesis of Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis and Adult-Onset Still's Disease. *Front Immunol.* 2020 Nov 5; 11:583513. doi: 10.3389/fimmu.2020.583513.
30. Костюк С.В., Малиновская Е.М., Ермаков А.В., Смирнова Т.Д., Каменева Л.В., Чвартацкая О.В., Лосева П.А., Ершова Е.С., Любченко Л.Н., Вейко Н.Н. Фрагменты внеклеточной ДНК усиливают транскрипционную активность генома мезенхимальных стволовых клеток человека, активируют TLR-зависимый сигнальный путь и ингибируют апоптоз. *Биомедицинская химия.* 2012; 58(6): 673-683.
 31. Shintani Y., Kapoor A., Kaneko M., et al. TLR9 mediates cellular protection by modulating energy metabolism in cardiomyocytes and neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Mar 26;110(13):5109-14. doi: 10.1073/pnas.1219243110.
 32. Harvey S.A., Dangi A., Tandon A., et al. The transcriptomic response of rat hepatic stellate cells to endotoxin: implications for hepatic inflammation and immune regulation. *PLoS One.* 2013 Dec 9;8(12):e82159. doi: 10.1371/journal.pone.0082159
 33. Mayer A.K., Muehmer M., Mages J., Gueinzus K., Hess C., Heeg K., Bals R., Lang R., Dalpke A.H. Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells. *J Immunol.* 2007 Mar 1;178(5):3134-42. doi: 10.4049/jimmunol.178.5.3134..
 34. Lebre M.C., van der Aar A.M., van Baarsen L., et al. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol.* 2007 Feb;127(2):331-41. doi: 10.1038/sj.jid.5700530.
 35. Lv F., Yu Y., Zhang B., et al. Inhibitory effects of mild hyperthermia plus docetaxel therapy on ER(+/-) breast cancer cells and action mechanisms. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2013 Dec;33(6):870-876. doi: 10.1007/s11596-013-1214-8.
 36. Pevsner-Fischer M., Morad V., Cohen-Sfady M., et al. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood.* 2007 Feb 15;109(4):1422-32. doi: 10.1182/blood-2006-06-028704.
 37. Brencicova E., Diebold S.S. Nucleic acids and endosomal pattern recognition: how to tell friend from foe? *Front Cell Infect Microbiol.* 2013 Jul 30;3:37. doi: 10.3389/fcimb.2013.00037.
 38. Swathi A., Dhinakar Raj G., Raja A., et al. Homology modeling and structural comparison of leucine rich repeats of Toll like receptors 1-10 of ruminants. *J Mol Model.* 2013 Sep;19(9):3863-74. doi: 10.1007/s00894-013-1871-3.
 39. Wang J., Shao Y., Bennett T.A., et al. The functional effects of physical interactions among Toll-like receptors 7, 8, and 9. *J Biol Chem.* 2006 Dec 8;281(49):37427-34. doi: 10.1074/jbc.M605311200.
 40. Liu Q., Ding J.L. The molecular mechanisms of TLR-signaling cooperation in cytokine regulation. *Immunol Cell Biol.* 2016 Jul;94(6):538-42. doi: 10.1038/icb.2016.18. Epub 2016 Feb 10.
 41. Köberlin M.S., Heinz L.X., Superti-Furga G. Functional crosstalk between membrane lipids and TLR biology. *Curr Opin Cell Biol.* 2016 Apr;39:28-36. doi: 10.1016/j.ccb.2016.01.010.
 42. Mohan S., Gupta D. Crosstalk of toll-like receptors signaling and Nrf2 pathway for regulation of inflammation. *Biomed Pharmacother.* 2018 Dec;108:1866-1878. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.019.
 43. Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 2011 May 27;34(5):637-50. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.006.
 44. Liu Q., Zhu Y., Yong W.K., Sze N.S., Tan N.S., Ding J.L. Cutting edge: synchronization of IRF1, JunB, and C/EBPbeta activities during TLR3-TLR7 cross-talk orchestrates timely cytokine synergy in the proinflammatory response. *J Immunol* 2015; 195: 801–805.
- ## References
1. Galeazzi M., Morozzi G., Piccini J. et al. Dosage and characterization of circulating DNA: present usage and possible applications in systemic autoimmune disorders. *Autoimmun Rev.* 2003 Jan;2(1):50-5. doi: 10.1016/s1568-9972(02)00101-5
 2. van der Vaart M., Pretorius P.J. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta.* 2008 Sep;395(1-2):186. doi: 10.1016/j.cca.2008.05.006.
 3. Lu Y., Zhu X., Liang G.X., et al. Apelin-APJ induces ICAM-1, VCAM-1 and MCP-1 expression via NF- κ B/JNK signal pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Amino Acids.* 2012 Nov;43(5):2125-36. doi: 10.1007/s00726-012-1298-7. Epub 2012 Apr 25. PMID: 22532031.
 4. Elshimali Y.I., Khaddour H., Sarkissyan M., et al. The clinical utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer patients. *Int J Mol Sci.* 2013 Sep 13;14(9):18925-58. doi: 10.3390/ijms140918925
 5. Forte V.A., Barrak D.K., Elhodaky M. et al. The potential for liquid biopsies in the precision medical treatment of breast cancer. *Cancer Biol Med.* 2016 Mar;13(1):19-40. doi: 10.28092/j.issn.2095-3941.2016.0007.
 6. Tamminga S., van Maarle M., Henneman L., et al. Maternal Plasma DNA and RNA Sequencing for Prenatal Testing. *Adv Clin Chem.* 2016;74:63-102. doi: 10.1016/bs.acc.2015.12.004.
 7. Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V., et al. Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:649747. doi: 10.1155/2013/649747.
 8. Glebova K., Veiko N., Kostyuk S., et al. Oxidized extracellular DNA as a stress signal that may modify response to anticancer therapy. *Cancer Lett.* 2015 Jan 1;356(1):22-33. doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.005.
 9. Korzeneva I.B., Kostyuk S.V., Ershova L.S., et al. Human circulating plasma DNA significantly decreases while lymphocyte DNA damage increases under chronic occupational exposure to low-dose gamma-neutron and tritium β -radiation. *Mutat Res.* 2015 Sep;779:1-15. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2015.05.004..
 10. Kostyuk S.V., Tabakov V.J., Chestkov V.V., et al. Oxidized DNA induces an adaptive response in human fibroblasts. *Mutat Res.* 2013 Jul-Aug;747-748:6-18. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.04.007.
 11. Loseva P., Kostyuk S., Malinovskaya E., et al. Extracellular DNA oxidation stimulates activation of NRF2 and reduces the production of ROS in human mesenchymal stem cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2012 Jun;12 Suppl 1:S85-97. doi: 10.1517/14712598.2012.688948.
 12. Pisetsky D.S. The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP. *Clin Immunol.* 2012 Jul;144(1):32-40. doi: 10.1016/j.clim.2012.04.006.
 13. Chiu Y.H., Macmillan J.B., Chen Z.J. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell.* 2009 Aug 7;138(3):576-91. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.015.
 14. Li H., Wang J., Wang J., et al. Structural mechanism of DNA recognition by the p202 HINa domain: insights into the inhibition of Aim2-mediated inflammatory signalling. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 2014 Jan;70(Pt 1):21-9. doi: 10.1107/S2053230X1303135X.
 15. Triantafilou K., Eryilmazlar D., Triantafilou M. Herpes simplex virus 2-induced activation in vaginal cells involves Toll-like receptors 2 and 9 and DNA sensors DAI and IFI16. *Am J Obstet Gynecol.* 2014 Feb;210(2):122.e1-122.e10. doi: 10.1016/j.ajog.2013.09.034.

16. Keating S.E., Baran M., Bowie A.G. Cytosolic DNA sensors regulating type I interferon induction. *Trends Immunol.* 2011 Dec;32(12):574-81. doi: 10.1016/j.it.2011.08.004.
17. Goulopoulou S., Matsumoto T., Bomfim G.F., et al. Toll-like receptor 9 activation: a novel mechanism linking placenta-derived mitochondrial DNA and vascular dysfunction in pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond).* 2012 Oct;123(7):429-35. doi: 10.1042/CS20120130.
18. Kostjuk S., Loseva P., Chvartatskaya O., et al. Extracellular GC-rich DNA activates TLR9- and NF- κ B-dependent signaling pathways in human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAMSCs). *Expert Opin Biol Ther.* 2012 Jun;12 Suppl 1:S99-111. doi: 10.1517/14712598.2012.690028.
19. Ghosh S., Dass J.F.P. Study of pathway cross-talk interactions with NF- κ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review. *Gene.* 2016 Jun 10;584(1):97-109. doi: 10.1016/j.gene.2016.03.008.
20. Bliksøen M., Mariero L.H., Torp M.K., et al. Extracellular mtDNA activates NF- κ B via toll-like receptor 9 and induces cell death in cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol.* 2016 Jul;111(4):42. doi: 10.1007/s00395-016-0553-6.
21. Holm C.K., Paludan S.R., Fitzgerald K.A. DNA recognition in immunity and disease. *Curr Opin Immunol.* 2013 Feb;25(1):13-8. doi: 10.1016/j.coi.2012.12.006.
22. Takagi M. Toll-like receptor--a potent driving force behind rheumatoid arthritis. *J Clin Exp Hematop.* 2011;51(2):77-92. doi: 10.3960/jslr.51.77.
23. Lee C.C., Avalos A.M., Ploegh H.L. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol.* 2012 Feb 3;12(3):168-79. doi: 10.1038/nri3151.
24. Goulopoulou S., McCarthy C.G., Webb R.C. Toll-like Receptors in the Vascular System: Sensing the Dangers Within. *Pharmacol Rev.* 2016 Jan;68(1):142-67. doi: 10.1124/pr.114.010090.
25. Lazaridis A., Gavriilaki E., Douma S., Gkaliagkousi E. Toll-Like Receptors in the Pathogenesis of Essential Hypertension. A Forthcoming Immune-Driven Theory in Full Effect. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 26;22(7):3451. doi: 10.3390/ijms22073451.
26. Fitzgerald K.A., Kagan J.C. Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell* (2020) 180(6):1044-66. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.041
27. Behzadi P., Garcia-Perdomo H.A., Karpiński T.M. Toll-Like Receptors: General Molecular and Structural Biology. *J Immunol Res.* 2021 May 29; 2021:9914854. doi: 10.1155/2021/9914854.
28. Miyake K., Shibata T., Ohto U., et al. Mechanisms controlling nucleic acid-sensing Toll-like receptors. *Int Immunol.* 2018 Mar 8; 30(2):43-51. doi: 10.1093/intimm/dxy016.
29. Jung J.Y., Kim J.W., Suh C.H., et al. Roles of Interactions Between Toll-Like Receptors and Their Endogenous Ligands in the Pathogenesis of Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis and Adult-Onset Still's Disease. *Front Immunol.* 2020 Nov 5; 11:583513. doi: 10.3389/fimmu.2020.583513.
30. Kostyuk S.V., Malinovskaya E.M., Ermakov A.V., Smirnova T.D., Kameneva L.V., Chvartatskaya O.V., Loseva P.A., Ershova E.S., Lyubchenko L.N., Veiko N.N. Fragmenty vnekletochnoy DNK usilivayut transkriptsionnyuyu aktivnost' genoma mezenkhimal'nykh stvolovykh kletok cheloveka, aktiviruyut TLR-zavisimyy signal'nyy put' i ingibiruyut apoptoz [Cell-free DNA fragments increase transcription in human mesenchymal stem cells, activate TLR-dependent signal pathway and suppress apoptosis]. *Biomeditsinskaya khimiya [Biomedical Chemistry]* 2012; 58(6): 673-683. (In Russ.)
31. Shintani Y., Kapoor A., Kaneko M., et al. TLR9 mediates cellular protection by modulating energy metabolism in cardiomyocytes and neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Mar 26;110(13):5109-14. doi: 10.1073/pnas.1219243110.
32. Harvey S.A., Dangi A., Tandon A., et al. The transcriptomic response of rat hepatic stellate cells to endotoxin: implications for hepatic inflammation and immune regulation. *PLoS One.* 2013 Dec 9;8(12):e82159. doi: 10.1371/journal.pone.0082159
33. Mayer A.K., Muehmer M., Mages J., Gueinzus K., Hess C., Heeg K., Bals R., Lang R., Dalpke A.H. Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells. *J Immunol.* 2007 Mar 1;178(5):3134-42. doi: 10.4049/jimmunol.178.5.3134.
34. Lebre M.C., van der Aar A.M., van Baarsen L., et al. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol.* 2007 Feb;127(2):331-41. doi: 10.1038/sj.jid.5700530.
35. Lv F., Yu Y., Zhang B., et al. Inhibitory effects of mild hyperthermia plus docetaxel therapy on ER(+/-) breast cancer cells and action mechanisms. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2013 Dec;33(6):870-876. doi: 10.1007/s11596-013-1214-8.
36. Pevsner-Fischer M., Morad V., Cohen-Sfady M., et al. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood.* 2007 Feb 15;109(4):1422-32. doi: 10.1182/blood-2006-06-028704.
37. Brencicova E., Diebold S.S. Nucleic acids and endosomal pattern recognition: how to tell friend from foe? *Front Cell Infect Microbiol.* 2013 Jul 30;3:37. doi: 10.3389/fcimb.2013.00037.
38. Swathi A., Dhinakar Raj G., Raja A., et al. Homology modeling and structural comparison of leucine rich repeats of Toll like receptors 1-10 of ruminants. *J Mol Model.* 2013 Sep;19(9):3863-74. doi: 10.1007/s00894-013-1871-3.
39. Wang J., Shao Y., Bennett T.A., et al. The functional effects of physical interactions among Toll-like receptors 7, 8, and 9. *J Biol Chem.* 2006 Dec 8;281(49):37427-34. doi: 10.1074/jbc.M605311200.
40. Liu Q., Ding J.L. The molecular mechanisms of TLR-signaling cooperation in cytokine regulation. *Immunol Cell Biol.* 2016 Jul;94(6):538-42. doi: 10.1038/icb.2016.18. Epub 2016 Feb 10.
41. Köberlin M.S., Heinz L.X., Superti-Furga G. Functional crosstalk between membrane lipids and TLR biology. *Curr Opin Cell Biol.* 2016 Apr;39:28-36. doi: 10.1016/j.ceb.2016.01.010.
42. Mohan S., Gupta D. Crosstalk of toll-like receptors signaling and Nrf2 pathway for regulation of inflammation. *Biomed Pharmacother.* 2018 Dec;108:1866-1878. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.019.
43. Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 2011 May 27;34(5):637-50. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.006.
44. Liu Q., Zhu Y., Yong W.K., Sze N.S., Tan N.S., Ding J.L. Cutting edge: synchronization of IRF1, JunB, and C/EBPbeta activities during TLR3-TLR7 cross-talk orchestrates timely cytokine synergy in the proinflammatory response. *J Immunol* 2015; 195: 801-805.