

УДК 577.032

ОБЗОР МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ЦИТОКИНА Tgfβ3 КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО АГЕНТА ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ СИНТЕЗА ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА

Обзор

© 2020 М.С. Божокин^{1,2*}, Ю.В. Сопова^{3,4,5}, Д.В. Качкин^{4,5}, А.А. Рубель^{4,5}, М.Г. Хотин²

¹ Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена, 195427 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: writeback@mail.ru

² Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики РАН, 199034 Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, 199034 Санкт-Петербург, Россия

⁵ Санкт-Петербургский государственный университет, научная лаборатория биологии амилоидов, 199034 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 04.01.2020

После доработки 26.02.2020

Принята к публикации 26.02.2020

Гиалиновый хрящ представляет собой аваскулярную соединительную ткань поверхности суставов, состоящую преимущественно из белков внеклеточного матрикса и небольшого количества высоко дифференцированных клеток – хондроцитов. В настоящее время исследуются различные методики восстановления поврежденной суставной поверхности, например, с использованием модифицированной клеточной культуры и биодеградируемого скаффолда. Активно изучаются молекулярные процессы, связанные с пролиферацией хрящевой ткани. Одним из важнейших белков среди цитокинов и факторов роста, влияющих на хондрогенез, является белок Tgfβ3, который выполняет критическую роль для нормальной пролиферации хрящевой ткани. Взаимодействуя с лигандами на поверхности клеточной мембраны, он запускает каскад молекулярных механизмов с участием транскрипционного фактора Sox9. В данном обзоре рассмотрено действие данного цитокина на активацию рецепторного комплекса и последующее внутриклеточное перемещение связанных с этим Smad медиаторов. Также изложен анализ связи данных процессов с увеличением экспрессии основных генов внеклеточного матрикса, таких как *col2a1* и *acan*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Tgfβ3, механизм действия, гиалиновый хрящ, Smad белки, внеклеточный матрикс.

DOI: 10.31857/S0320972520040041

Гиалиновый хрящ – это аваскулярная соединительная ткань поверхности суставов, состоящая преимущественно из белков внеклеточного матрикса и небольшого количества (~ 5% общей массы) высокоспецифичных клеток – хондроцитов [1].

Основными белками внеклеточного матрикса являются коллаген II типа и агрекан. Насыщенность гиалинового хряща водой (2/3 от об-

щей массы) позволяет ему обратимо деформироваться и выдерживать большие механические нагрузки, а гладкая поверхность – осуществлять сгибание сустава с минимальным трением [2]. Однако способность хряща к регенерации весьма ограничена, поэтому повреждения, возникающие на его поверхности, быстро увеличиваются с течением времени и ведут к дальнейшей дегенерации гиалинового слоя как в диаметре, так и в глубину [3]. В результате дегенеративных процессов, происходящих в нём, суставной хрящ разрушается, что ведёт к нарушению функции сустава, и, как следствие, к необходимости проведения процедуры эндопротезирования. Наиболее часто такой процедуре подвергаются самые нагружаемые суставы: коленный и тазобедренный [4].

Количество оперативных вмешательств в области коленного сустава увеличивается из года в

Принятые сокращения: КИК – клеточно-инженерная конструкция; ММСК – мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки; GDF – факторы роста и дифференцировки; Tgfβ – трансформирующий фактор роста β; Vmp – костный морфометрический белок; FSH – фолликулостимулирующий гормон; MIF – мюллеровский ингибиторный фактор; SUM – small ubiquitin-like modifier; SARA – smad anchor for receptor activation; SBE – smad-binding element; Sp1 – specialprotein.

* Адресат для корреспонденции.

год из-за разных факторов (травмы, заболевания, спортивные нагрузки и т.д.). В 2007 г. Kurtz спрогнозировал, что из-за целого ряда факторов (травмы, спортивные нагрузки, ожирение, различные заболевания, генетические предрасположенности и др.) с 2007 по 2030 гг. количество эндопротезирований только коленного сустава в США увеличится с 700 тыс. до 3,4 млн в год [5]. Несмотря на то, что современная хирургия располагает большим количеством методик (например, хондропластика и микрофрактурирование [4]), направленных на восстановление повреждённого гиалинового слоя, данная проблема в полном объеме до сих пор не решена.

В 1987 г. Brittberg et al. [6] разработали принципиально новую методику по трансплантации в область дефекта суставного хряща культуры аутологичных хондроцитов, предварительно культивируемой *in vitro* в течение некоторого времени. В настоящее время данную технологию существенно улучшили путем предварительной активации (модификации) клеток [7]. На пролиферацию клеточной культуры влияют различными способами: добавляют факторы роста, изменяют газовый состав смеси при культивации, оказывают механическое воздействие, осуществляют трансфекцию или трансдукцию клеток, направленную на изменение экспрессии ключевых генов, влияющих на хондрогенез. Затем производят совмещение клеточной культуры с биодеградируемым носителем (скаффолдом), и уже получившуюся клеточно-инженерную конструкцию (КИК) трансплантируют в область дефекта гиалинового хряща.

Для создания и успешного применения таких конструкций важно детальное понимание молекулярных механизмов, ответственных за регуляцию регенерации хрящевой ткани, чтобы получившаяся КИК была устойчивой к механическим нагрузкам. Главной задачей для получения положительного эффекта от применения КИК в среднесрочной перспективе является пролиферация клеточной культуры с формированием гиалиноподобного регенерата в области дефекта и отсутствие деградации трансплантированного объекта. В настоящее время уделяется большое внимание анализу влияния действия различных факторов на клеточную культуру в составе КИК, в том числе, цитокину Tgf β 3, играющему одну из ключевых ролей в пролиферации клеток при хондрогенезе [8, 9].

Данный обзор посвящён механизмам действия Tgf β 3 на увеличение экспрессии генов основных белков внеклеточного матрикса (коллагена II типа и агреккана) и, как следствие, возможности его применения в ближайшем будущем в качестве терапевтического агента.

КЛЕТочНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕННОЙ ПОВЕРХНОСТИ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА

Существует целый ряд причин возникновения дефектов в коленных и тазобедренных суставах: травмы, различные заболевания, избыточный вес, чрезмерные нагрузки или генетическая предрасположенность [10]. Исследование проблемы восстановления повреждённой поверхности сустава началось ещё в XVIII в. В 1743 г. Вильям Хантер впервые отметил, что однажды повреждённый хрящ уже никогда не восстанавливался, а в 1853 г. Джеймс Рагет написал: «Неизвестно ни единого случая, когда потерянная часть хряща восстанавливалась новым, хорошо сформированным хрящом» [1]. В середине XX в. исследователи предположили гипотезу, что из-за аваскулярной природы хряща для его регенерации нужен доступ питательных веществ и клеточных элементов в зону дефекта. Так, в 1960-х гг. появилась технология субхондральной туннелизации и её модернизированная версия – микрофрактурирование [11]. Суть метода состояла в том, что в зоне дефекта гиалинового хряща создавались множественные отверстия («туннели») в подлежащую субхондральную кость, через которые мигрировали клетки костного мозга. Технология позволяла получить положительный результат, но лишь в краткосрочной перспективе, и с течением времени образовавшийся на месте первоначального повреждения регенерат вновь деградировал. Несмотря на существенные недостатки, данная технология до сих пор применяется в клинической практике во многих странах мира [1].

В 1994 г. группа шведских исследователей во главе с Brittberg M. предложила принципиально новую методику [6]. Суть данного метода заключалась в том, что у пациента предварительно осуществляли забор аутологичных хондроцитов, далее проводили их культивирование *in vitro*, и затем осуществляли трансплантацию культуры клеток в область дефекта. Технологию назвали ACI (autologous chondrocyte implantation). Позже вместо культуры хондроцитов было предложено использовать культуру мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток (ММСК), индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs – induced pluripotent stem cells), а также клеток из других источников [12] в сочетании с биодеградируемым носителем. Так началась эпоха применения клеточно-инженерных конструкций для замещения дефектов гиалинового хряща. Применение такой

комбинации позволяло зафиксировать трансплантируемую культуру клеток внутри области дефекта, и, тем самым, существенно уменьшить миграцию клеток из зоны повреждения на начальном этапе, а применение биodeградируемого полимера защищало клетки от значительных механических нагрузок непосредственно после трансплантации. Уже в среднесрочной перспективе были получены положительные результаты, однако вскоре стало понятно, что на больших сроках регенерат снова подвергался деградации [7]. Был сделан вывод, что, скорее всего, используемая клеточная культура (хондроцитов, ММСК или других клеток) не позволяла за короткое время создать регенерат, способный выполнять функции неповрежденного гиалинового хряща в полной мере [1].

Тогда возникло предложение предварительно искусственно модифицировать используемую культуру клеток с целью придания или усиления тех свойств, которые у неё первоначально отсутствовали для достижения лучшего терапевтического эффекта [1].

Потенциал для модификации клеточной культуры в настоящее время огромен. Однако принципиальных групп методов модификации клеточной культуры всего три:

1) физическое (механическое) воздействие — осуществляется с помощью электромагнитного излучения, механического давления, изменения газовой среды и т.д. [13–16]. Данная процедура относительно проста в исполнении и экономически доступна, однако недостаточно эффективна. Её возможности по модификации клеточной культуры ограничены;

2) химическое воздействие представляет собой добавление к культуре клеток различных агентов: химических соединений, цитокинов, гормонов, факторов роста, рекомбинантных белков и т.д. [17, 18];

3) генетическое воздействие состоит в изменении генетического материала отдельных клеток или всей популяции [19, 20]. Следствием этого является изменение уровня экспрессии отдельных генов и/или увеличение (или прекращение) синтеза различных белков. Такие изменения генотипа клеток являются методически непростой задачей, так как эволюционно природа создала множество барьеров для проникновения чужеродной генетической информации в клетки.

Для генетической модификации культуры клеток и восстановления поврежденной суставной поверхности исследователи обратили свой взгляд на белки, участвующие в регуляции хондрогенеза и образовании гиалинового хряща. Одним из таких белков является цитокин Tgfβ3,

имеющий ключевое значение при хондрогенной пролиферации суставного хряща [21].

Цитокин Tgfβ3 играет важнейшую роль в формировании гиалинового хряща, пролиферации, регуляции синтеза основных компонентов внеклеточного матрикса, таких, как коллаген II типа и агрекан, а также способствует ингибированию ферментов, ответственных за деградацию матрикса, например, коллагеназы 3, кодируемой геном *MMP13* [22].

История изучения белка Tgfβ3 насчитывает более 40 лет, и в настоящее время данному белку посвящено порядка 70 тыс. статей, согласно базе PubMed [23]. Многие белки, принимающие участие в регуляции пролиферации клеток, изначально были названы «факторами роста», так как именно изменение пролиферации клеточной культуры было проще всего анализировать [24]. Именно на это обратили внимание в 1978 г. итальянские учёные Todaro и de Larko, которые обнаружили, что клетки вирусно-трансформированной мышечной саркомы 3T3 продуцировали специальный «фактор», под влиянием которого неопухольевые клетки почки крысы (NRK) приобретали неопластический фенотип [25]. Данный фактор назвали «sarcoma growth factor» (SGF) и связали его активность со способностью клеток расти на мягком агаре [26]. Было показано, что SGF на самом деле состоит из двух белков. Первый белок получил название «трансформирующий ростовой фактор-альфа» (transforming growth factor-α, TGF-α). Этот белок стимулировал рост только маленьких колоний неопластических крысиных фибробластов. Второй белок, стимулировавший рост большего количества крупных колоний, назвали «трансформирующий ростовой фактор-бета» (transforming growth factor β) [27]. Впервые этот белок был выделен и подробно описан в 1983 г. американскими учёными во главе с R. Assoian [28]. Группа похожих по строению белков рассмотрена далее в данном обзоре.

В настоящее время у человека открыто 33 белка, сходных по строению своей димерной структуры и входящих в т.н. «суперсемейство трансформирующего ростового фактора β» [24]. Белки данной группы выполняют важнейшую роль в клеточной дифференцировке, миграции и адгезии [21]. Нарушения в синтезе и механизме регуляции активности белков этого семейства приводят к большому количеству заболеваний человека, включая тканевые фиброзы [29] и онкологические заболевания [30–32].

«Суперсемейство Tgfβ» у человека имеет сложную иерархию, однако, несмотря на разнообразие данных белков, все члены и подгруппы этого семейства имеют сходную димерную

структуру, похожую на «крылья бабочки». Большинство членов семейства дополнительно стабилизируются дисульфидными связями между цепями, которые связывают момеры вместе собой [33, 34].

«Суперсемейство Tgf β » можно принципиально разделить на пять подгрупп:

1) изоформы белков непосредственно подсемейства Tgf β (Tgf β 1, Tgf β 2, Tgf β 3). Tgf β 1 имеет фундаментальное значение для развития, физиологии и патологии сосудистой системы [35]. Tgf β 2 связывают с развитием дегенеративных процессов органов зрения [36, 37]. Tgf β 3 принимает участие в процессах, связанных с формированием структур дермы (или эпидермиса), а также пролиферацией и образованием гиалинового хряща [37–39];

2) костные морфометрические белки BMP (bone morphometric proteins) – участвуют в формировании и пролиферации костной ткани, стимулируют экспрессию гена *Runx2* [40], кодирующего белок runt-related transcription factor2, также известный под названием CBF-alpha-1 (core-binding factor subunit alpha-1), являющийся ключевым транскрипционным фактором для остеобластической дифференцировки пролиферации клеток;

3) факторы роста и дифференцировки GDF имеют гомологию с костными морфометрическими белками, поэтому в некоторых классификациях данные две группы объединены. Белки GDF играют ключевую роль при дифференцировке во время эмбриогенеза, а также при пролиферации клеток в сформированных тканях, таких как селезёнка, тимус, яичник и другие [33];

4) активины/ингибины. Данные белки первоначально описаны в работе D. Yu et al. в качестве регуляторов фолликул стимулирующего гормона (FSH) [41]. Название эти белки получили в 1987 г., когда N. Ling et al. обнаружили свойство активинов стимулировать высвобождение FSH из гипофиза, в отличие от ингибина, который мог избирательно блокировать синтез и секрецию гормона FSH [42, 43].

В настоящее время известно, что данные представители суперсемейства Tgf β принимают участие во многих процессах, начиная от ранних стадий эмбрионального развития и стимулирования секреции гормонов у позвоночных и заканчивая специализированными функциями в дифференцированных тканях и клетках [44];

5) остальные белки: в эту группу входят белки Lefty, Nodal, мюллеровский ингибиторный фактор (MIF) и другие белки [45]. Они демонстрируют слабое сходство с димерной структурой остальных членов суперсемейства Tgf β , од-

нако, похожи по строению мономерных частей [33, 34].

Их функции разнообразны. Например, MIF является важным регулятором дифференцировки репродуктивных органов в процессе эмбрионального развития [46]. Lefty играет важную роль в ингибировании различных сигнальных путей, влияющих на направление дифференцировки [47]. Nodal – белок, играющий одну из ключевых ролей в раннем эмбриональном развитии и формировании мезодермы у позвоночных [48]. Номенклатура названий белков суперсемейства Tgf β довольно сложна, и многие из них исторически получили несколько названий, которые не всегда верно отражают их функции [49].

Несмотря на всё многообразие функций, которые выполняют белки суперсемейства Tgf β , наиболее заметное влияние они оказывают на клеточную дифференцировку в целом, и синтез внеклеточного матрикса, в частности [49].

В связи со значительной ролью, которую играет непосредственно белок Tgf β 3 в пролиферации и хондрогенной дифференцировке, в данной работе мы подробно рассмотрим цепочку молекулярных процессов, начиная от взаимодействия белка с рецепторами на поверхности клеточной мембраны и заканчивая увеличением экспрессии генов внеклеточного матрикса.

Изоформы белка Tgf β представляют собой небольшие секреторируемые во внеклеточное пространство гомодимерные сигнальные белки [45], у млекопитающих выявлено только три из них: Tgf β 1, Tgf β 2 и Tgf β 3. Белки семейства Tgf β являются высоко консервативными, степень идентичности между данными изоформами у человека и некоторых млекопитающих может достигать почти 100%, поэтому в экспериментальных работах на животных часто используют белок человеческого происхождения.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ БЕЛКА Tgf β 3

Клеточный сигналинг, опосредованный белками подсемейства изоформ Tgf β , начинается с взаимодействия белка Tgf β с его рецепторами T β R, находящимися на плазматической мембране. Три изоформы Tgf β 1, Tgf β 2 и Tgf β 3 связываются с рецепторами T β R1, T β R2 и T β R3. При этом один и тот же белок может присоединяться ко всем вышеуказанным рецепторам, но с различной аффиностью [24, 50]. На поверхности большинства клеток организма находятся рецепторы T β R1 и T β R2, количество которых варьируется от 5 до 10 тыс. на клетку, количество рецепторов T β R3 может составлять до 200 тыс. на одну клетку [24, 51]. Рецепторы являют-

ся двух специфическими киназами (способны фосфорилировать как серин и треонин, так и тирозин [52], передающими сигнал из внеклеточного пространства к внутриклеточным медиаторам — Smad белкам, которые постоянно циркулируют между цитоплазмой и ядром. Рецептор TβRII фосфорилирует TβRI, что инициирует Smad-опосредованный сигналинг [21, 53]. В ядре Smad белки выполняют роль транскрипционных факторов и взаимодействуют с определёнными последовательностями ДНК в промоторной области, таким образом регулируя экспрессию различных генов. Белок Tgfβ3 может активировать не только сигнальный путь Smad (канонический путь — canonical pathway), но и другие сигнальные пути (неканонический путь), например, путь митоген-активируемой протеинкиназы MAPK (ERK, JNK и p38), сигнальный путь фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), протеинкиназы B (AKT) и протеинкиназы (mTOR — мишень рапамицина у млекопитающих) — (PI3K/AKT/mTOR). Эти пути напрямую не связаны с увеличением синтеза внеклеточного матрикса, и поэтому в данной работе подробно рассмотрены не будут.

РЕЦЕПТОРЫ

На поверхности клетки могут находиться три вида рецепторов: TβRI, TβRII и TβRIII.

К TβRI относятся активин-рецепторные киназы 1–7 (ALK1-7). При этом в сигналинге, опосредованном Tgfβ, принимает участие киназа ALK5.

К TβRII относятся непосредственно TβRII (TGF-β type II или TβRII, который является серин-треониновой киназой), рецептор для костного морфометрического белка 2 (BMPRII), активинный рецептор II (ACTRII, ACTRIIB), а также рецептор антимюллерового гормона II (AMHRII).

К TβRIII относятся белки бетагликан и эндоглин, которые по большей части действуют в виде корецепторов для увеличения эффективности передачи сигнала Tgfβ [50].

На поверхности клетки рецепторы существуют в виде мономеров, димеров и гетеромеров, что позволяет транслировать сигнал в клетку только в случае образования упорядоченного рецепторного комплекса при его взаимодействии с лигандом [24].

При присоединении лиганда к соответствующему рецептору происходит образование тетрамерного гетерокомплекса, состоящего из двух рецепторов I типа и двух рецепторов II типа [54–59].

Несмотря на то, что большинство исследователей считает, что для передачи сигналов необходимо образование именно тетрамерного комплекса, в одной работе Huang et al. показали, что также и димер, состоящий из рецепторов TβRI и TβRII, способен эффективно передать во внутриклеточное пространство соответствующий сигнал [60]. После образования тетрамерного гетерокомплекса происходит трансфосфорилирование TβRI под действием TβRII и запускается дальнейшая цепочка передачи сигналов во внутриклеточное пространство.

Активность рецепторов также может регулироваться другими посттрансляционными модификациями, например, убиквитинированием [61–64]. Так как оба рецептора являются полиубиквитинированными, то при удалении убиквитина с рецептора TβRI происходит стабилизация рецепторного комплекса и увеличивается эффективность передачи сигнала [65]. Таким образом, ингибирование убиквитинлигазы приводит к дополнительной активации всего комплекса передачи сигналов. Аналогично убиквитинированию на рецепторы влияет и сумоилирование (присоединение белка SUMO) (small ubiquitin-like modifier), приводя к их стабилизации и повышению эффективности передачи сигналов. Сумоилирование также регулирует клеточную локализацию рецепторов [66], влияя, таким образом, на их совместную активацию. Другим механизмом активации является действие шаперона Hsp90, который стабилизирует оба рецептора на поверхности клеточной мембраны и блокирует их взаимодействие с E3 протеин-убиквитинной лигазой (убиквитинлигазой), кодируемой геном *Smurf2*. Данная лигаза взаимодействует с белком Smad7, образует стабильный комплекс с фосфорилированными белками Smad2 и Smad3 и инактивирует их.

Для рецепторного комплекса TβRI/TβRII было исследовано большое количество белков, которые либо ингибируют передачу сигналов (BAMBI, STRAP, Tollip, SIK, FKBP12) [21], либо, наоборот, её усиливают (TSC-22). Протеолитическое расщепление рецепторов под действием белков TACE или ADAM17 ингибирует дальнейший механизм передачи сигналов с помощью Tgfβ [67].

Smad БЕЛКИ

Белок Tgfβ3 регулирует экспрессию генов путем взаимодействия с рецепторами TβRI/TβRII, что индуцирует опосредованную активацию внутриклеточных Smad белков. Эти белки, которые были первоначально открыты у

дрозофилы, своё название получили от сокращения от *Caenorhabditis elegans* SMAlI («маленький» червь) и от *Drosophila* MAD («mothers against decapentaplegic»). Smad белки передают сигнал с внутренней части клеточной мембраны в ядро для активации экспрессии различных генов (в том числе генов внеклеточного матрикса). Семейство Smad белков является важнейшим медиатором регуляции сигналинга Tgf β 3, на сегодняшний день описано большое количество механизмов регулирования действия данных белков [68].

Известно три разновидности белков Smad, включающих 8 членов данного семейства, которые можно разделить на три принципиальные подгруппы:

1) рецептор-регулируемые R-Smad (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, Smad9 (иногда в литературе встречается обозначение Smad8 или Smad8/9 – так как у белка, кодируемого геном *Smad9*, есть две изоформы – Smad8 и Smad8b [69]);

2) партнеры Co-Smad (в литературе встречаются обозначения Co-Smad или CSmad, или Smad4 (Smad4 «COmmon partner»));

3) ингибиторы I-Smad (Smad6, Smad7).

Представители Smad белков – Smad1, Smad5 и Smad8/9, – относящиеся к группе R-Smad, а также представитель I-Smad – белок Smad6, участвуют в передаче сигналов, опосредованных белками BMPs и GDF [40, 70] но не белками Tgf β 1-3. Действие белков Smad 1,5,8/9 важно, так как они регулируют процессы, связанные с остеогенезом. R-Smad могут активировать и/или блокировать транскрипцию фактора Runx2 – главного регулятора развития костной ткани. Хондрогенная и остеогенная дифференцировка являются взаимно исключающими одновременными процессами по отношению к одной клетке. Поэтому активация одного пути неминуемо ведет к ингибированию другого. Например, было показано, что белки Smad2 и Smad3 ингибируют экспрессию гена *Runx2* [71]. Smad3, проникая в ядро в составе комплекса Smad2/3 + Smad4, рекрутирует гистон-деацетилазу II (HDAC), которая действует как ко-репрессор в Smad3-опосредованной транскрипционной репрессии фактора Runx2, что подтверждает негативное влияние воздействия Tgf β на остеогенез [71, 72].

Белки R-Smad содержат два домена МН1 и МН2, соединенные линкерной последовательностью. Домен МН1 имеет шпильчатую структуру, содержит сигнал ядерной локализации и ответственен за связывание с ДНК и мРНК, различными ДНК-связывающими ко-факторами, ко-активаторами и ко-репрессорами [73]. До-

мен МН2 содержит петлю L3, способствующую взаимодействию R-Smads с внутриклеточной частью рецептора T β RI. При образовании гетеротетрамерного комплекса из двух рецепторов T β RI и двух T β RII белок T β RI фосфорилирует два остатка серина на С-конце R-Smad в мотиве SSXS (Ser-Ser-X-Ser) [21]. В результате данного действия два белка R-Smad отсоединяются от внутриклеточной части гетерорецепторного комплекса, называемой «SARA» (smad anchor for receptor activation), после чего два белка R-Smad (Smad2 + Smad3) и один co-Smad (Smad4) в составе одного комплекса направляются к ядру. Они транспортируются в ядро через ядерные поры и с помощью МН1 домена связываются с ДНК [73]. В ядре домен МН2 взаимодействует с различными ядерными факторами и контролирует транскрипцию большого количества генов. Ингибирование данного сигнального пути происходит за счет различных действий Smad7: взаимодействия с R-Smad, дефосфорилирования гетерорецепторного комплекса, индукции деградации активированного рецепторного комплекса, взаимодействия с убиквитинлигазой, а также препятствования присоединения к ДНК комплекса R-Smads и co-Smad. При этом ингибирование сигналинга Tgf β 3 белком Smad7 не является однозначным процессом. В общем виде Smad7 выполняет непростую роль, обеспечивая отрицательную обратную связь Tgf β 3 сигналинга и поддерживая его в определённых границах [50, 54, 74, 75].

В дополнение к трем основным событиям, которые приводят к активации белков Smad (фосфорилирование SSXS мотива белками R-Smads, отщепление комплекса двух R-Smad и одного co-Smad от тетрамерного рецепторного комплекса, а также нуклеоплазматического движения Smad белков из цитоплазмы в ядро и обратно), Smad белки являются субъектами разного рода посттрансляционных модификаций, таких как убиквитирование, сумоилирование, ацетилирование и АДФ рибозилирование, а также фосфорилирование линкерной последовательности, что может влиять на их активность, а также на передачу сигналов Tgf β 3.

ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ ПЕРЕМЕЩЕНИЕ БЕЛКОВ Smad И ИХ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ РЕЦЕПТОРНОГО КОМПЛЕКСА T β RI/T β RII

Независимо от наличия или отсутствия лигандов, Smad-белки постоянно циркулируют между цитоплазмой и ядром, но комплекс белков Smad2,3/Smad4 обнаруживается только в ядре [70]. Однако было показано, что данный

комплекс белков взаимодействуя с белками Importin7,8 может активно транспортироваться в ядро и накапливаться там, так как эффективность импорта этого комплекса в 4 раза больше эффективности экспорта [76, 77]. В результате рецептор-опосредованного фосфорилирования и ассоциации двух белков R-Smad с одним со-Smad, комплекс из трёх белков проникает в ядро [21, 70]. Нуклеоплазматический транспорт макромолекул в/из ядра происходит через комплекс ядерных пор, пронизывающих ядерную оболочку. В отсутствие активации рецепторов (воздействия белка Tgf β) Smad7, являющийся репрессором данного сигнального пути, накапливается в ядре, а после активации рецепторов переносится в цитоплазму. Экспорт отдельных белков Smad из ядра может происходить при помощи белков-экпортинов [78]. При попадании в ядро белок Smad 7 блокирует образование комплекса ДНК + Smad (2,3,4) путем связывания домена МН2 белка Smad7 с ДНК [74]. Проведённые исследования подтверждают, что перемещения белков Smad между ядром и цитоплазмой являются активными и направленными процессами, а не пассивной диффузией [78, 79]. По всей видимости, именно концентрация белков Smad в ядре является показателем интенсивности взаимодействия белка Tgf β 3 с клеточными рецепторами [70]. Постоянное перемещение белков семейства Smad между ядром и цитоплазмой позволяет обеспечить контроль внутриклеточных медиаторов для регуляции активности рецепторного комплекса, выполняя, таким образом, роль обратной связи, что является необходимым условием передачи сигнала у всех многоклеточных организмов. Распределение Smad белков внутри клетки и регуляция их перемещения между ядром и цитоплазмой до конца не изучена, но очевидно, что этот процесс вовлечен в активацию или репрессию экспрессии генов [24].

ФУНКЦИИ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА Smad В ЯДРЕ

При попадании в ядро комплекс белков Smad может связываться с ДНК и регулировать транскрипцию. Активирующая или репрессирующая активность комплекса белков Smad требует обязательной ассоциации его с факторами и кофакторами транскрипции, которые связывают специфические последовательности ДНК в проксимальных промоторных областях или энхансеры с большой аффинностью [24]. Способность регуляции экспрессии генов Smad белками зависит от многих причин: ассоциации с

транскрипционными факторами и ко-регуляторами, таргетного гена, физиологического состояния клетки и строения Smad комплекса [80, 81]. Было показано, что данный комплекс связывается с низкой аффинностью с GC богатой последовательностью «Smad-binding element» (SBE) (например, GTCT или AGAC). Белки R-Smad в активированном комплексе (два R-Smad и один со-Smad) с помощью домена МН2 связываются с транскрипционными факторами для идентификации генов-мишеней и регуляции их экспрессии, что повышает специфичность и аффинность связывания с ДНК [73]. Многие транскрипционные факторы, связывающиеся с комплексом Smad белков, являются тканеспецифичными и, таким образом, играют важную роль в регуляции экспрессии генов.

В работе Qiao et al. [82] было показано увеличение синтеза коллагена II типа – основного белка внеклеточного матрикса гиалинового хряща, в ответ на воздействие белком Tgf β , однако, данный результат был получен независимо от увеличения экспрессии гена коллагена II типа, а также Smad опосредованного сигналинга. Такие данные свидетельствуют о наличии другого пути активации синтеза коллагена II типа. В работе R. Bhogal et al. [83] был показан альтернативный путь увеличения экспрессии коллагена II, который связан с увеличением экспрессии гена, кодирующего один из рецепторов T β R. В работе этих же авторов на культуре фибробластов *in vitro* было показано, что уровень экспрессии гена коллагена I типа (вида коллагена, не характерного для гиалинового хряща) снижался в результате воздействия на культуру клеток белком Tgf β [83].

Белок Smad 2/3, проникая в ядро, связывается там с транскрипционными ко-активаторами (например, p300/CBP). Эти белки, в свою очередь, взаимодействуют с транскрипционным фактором Sox9 [40], который является одним из ключевых транскрипционных факторов при активации хондрогенеза. Таким образом, белки Smad2 и Smad3 активируют экспрессию и синтез коллагена II типа [84]. Взаимодействие Smad с активатором p300/CBP-associated factor (PCAF) критически необходимо для формирования хряща [85]. Взаимодействие данных белков с факторами транскрипции FoxO (forkhead transcription factors (FoxO1,3,4)) приводит к пролиферации и росту хрящевой ткани, что было показано на экспериментах на рыбах *Danio rerio* [86]. Кроме того, взаимодействие между путями регуляции, включающими Smad белки и транскрипционные факторы FoxO, обеспечивает интеграцию сигнальных путей, активируемых Tgf β и PI3K/АКТ/mTOR [87, 88]. Такое перекрёстное взаимодействие может быть также достиг-

нуто за счет совместного использования генов-мишеней Smad [89, 90].

Ранее была показана возможность взаимодействия белков Smad2 и Smad3, которые являются медиаторами Tgf β сигналинга, с транскрипционным фактором Sp1 – Special protein1 [50, 91]. Одновременно было показано, что увеличение экспрессии гена *Sp1* влияет на увеличение экспрессии гена *Sox9*, и, соответственно, увеличивает синтез коллагена II типа [92]. Аналогичные данные были получены и для транскрипционных факторов cJun/c-Fos (другое название, встречающееся в литературе – Ap1) и Sertadt1 [50].

При активации рецептора T β RI происходит увеличение продукции агрекана [93] – другого важнейшего белка внеклеточного матрикса. При активации регуляции по пути Smad 1,5,8 увеличивается синтез металлопротеиназы 13 (ММР-13) [93], ответственной за деградацию внеклеточного матрикса, что, по-видимому, обусловлено связью белков Smad1,5,8 с Runx2 – ключевым транскрипционным фактором при остеогенезе.

Общая схема регулирования экспрессии гена коллагена II типа (*col2a1*) через Smad медиаторы и Tgf β передачу сигналов представлена на рисунке.

РЕГУЛИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МАТРИКСА С ПОМОЩЬЮ микро РНК

Другим механизмом передачи сигналов под действием белка Tgf β 3, влияющим на регуляцию экспрессии генов внеклеточного матрикса гиалинового хряща, является взаимодействие с микроРНК. Данные молекулы являются небольшими (18–25, в среднем, 22 нуклеотида) некодирующими последовательностями РНК. Они комплементарны определённому фрагменту мРНК (у животных это обычно 3' некодирующая область), и их взаимодействие с мРНК вызывает ингибирование трансляции [94, 95]. Биосинтез микроРНК начинается с транскрипции генов микроРНК с помощью РНК полимеразы II и синтеза длинных фрагментов, известных как пре-микроРНК. В результате ядерного процессинга у позвоночных пре-микроРНК идентифицируется белком Di (george syndrome critical region8) (DGCR8), который при взаимодействии с комплексом Drosha разрезает пре-микроРНК. Получившиеся фрагменты экспортируются из ядра белком Exportin-5 и в результате цитоплазматического процессинга данные фрагменты разрезаются рибонуклеазой Dicer [96]. Связывание Tgf β с рецепторами модулирует экспрессию микроРНК

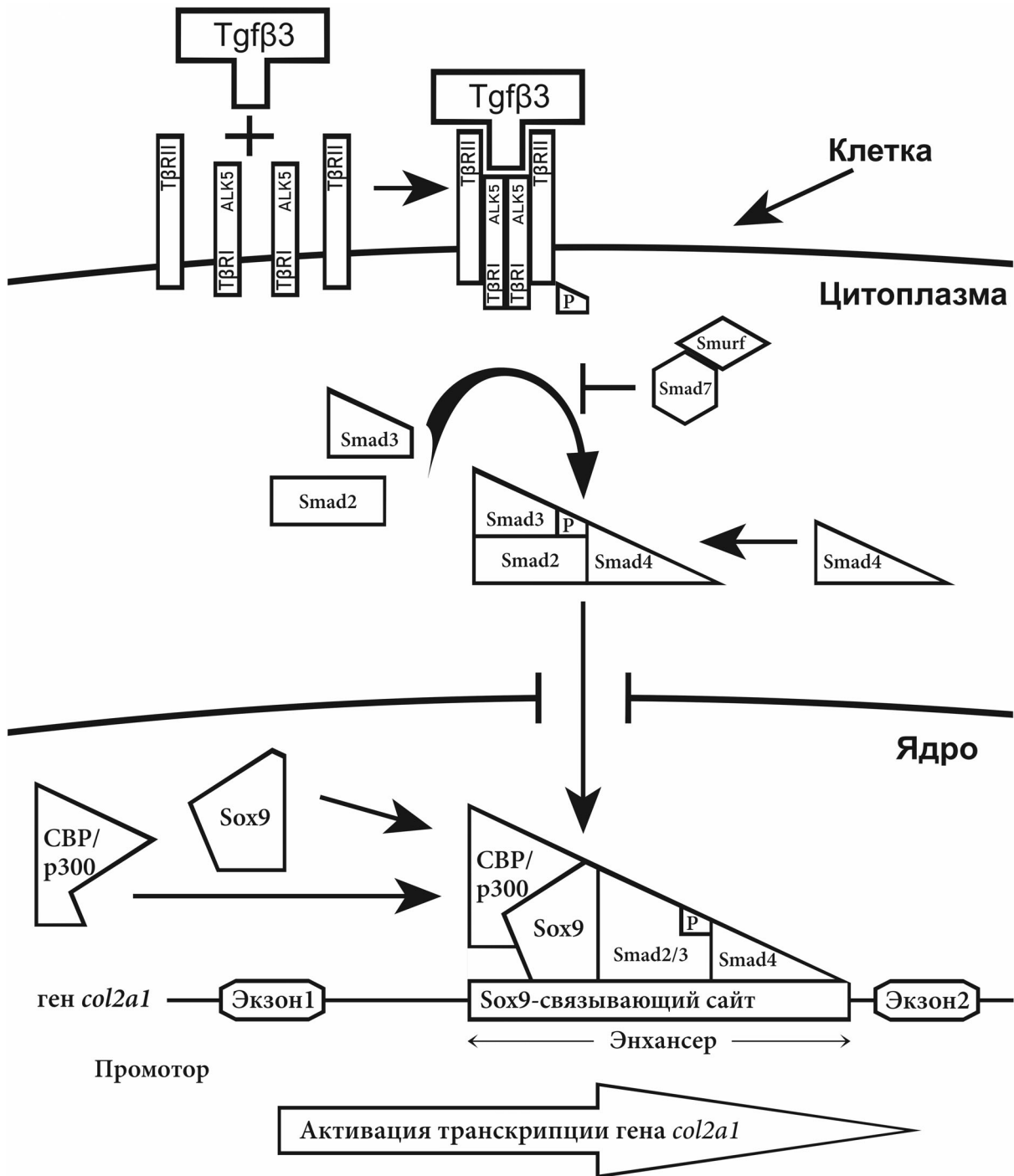
как транскрипционно – через ДНК-связывающую активность комплексов Smad, так и посттранскрипционно – через РНК-связывающую активность R-Smad [21].

На сегодняшний момент открыто и описано большое количество микроРНК, влияющих на регуляцию Tgf β сигналинга [21]. Некоторые из них принимают участие в процессах, связанных с хондрогенезом. Например, микроРНК410 взаимодействует с регуляторным путём Wnt, который перекрёстно связан с механизмом передачи сигналов, инициируемым Tgf β белком [97]. Было показано, что микроРНК присоединяется к 3'-нетранслируемой области гена *wnt3a*, который регулирует сигнальный путь Wnt. Культура клеток, у которых искусственно активирована микроРНК410, увеличивает синтез основных белков внеклеточного матрикса гиалинового хряща, таких как коллаген II типа, агрекан, а также синтез транскрипционного фактора Sox9, важного при хондрогенезе [97]. МикроРНК495 является важным регулятором хондрогенной дифференцировки [98], так как в 3'-нетранслируемой области гена *sox9* есть область связывания с данной микроРНК. Сверхэкспрессиями РНК495 репрессирует экспрессию генов, кодирующих белки внеклеточного матрикса (коллаген II типа и агрекан), а ингибирование ее экспрессии приводит к обратному эффекту.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ Tgf β 3 ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА

Использование различных белков, стимулирующих процессы регенерации хряща и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток, как по отдельности, так и в комбинации между собой, в настоящее время является перспективным направлением в терапии целого ряда заболеваний опорно-двигательного аппарата, что было показано, в том числе, и в наших пилотных экспериментах [17]. Белок Tgf β 3 активно используется для восстановления гиалинового слоя, при этом он не только стимулирует хондрогенез [99–101, 100], но и подавляет активность медиаторов воспаления и матриксных металлопротеиназ, таких как IL-1, MMPs и TNF- α [101, 102]. Трансплантация биодegradуемых носителей (на основе фиброина или внеклеточного матрикса хондроцитов), содержащих Tgf β 3, приводила к регенерации повреждений хряща *in vivo*, при этом комбинация Tgf β 3 с механозависимым фактором роста MGF давала синергический эффект [103–105].

Следующим шагом на пути разработки трансплантатов, способных эффективно замещать



Активация транскрипции гена *col2a1* под действием белка Tgfβ

дефекты хряща, стало использование матрикса, содержащего не только белок Tgfβ3, но и различные варианты стволовых или частично дифференцированных клеток. Так, Wang et al. успешно использовали деминерализованную костную ткань в сочетании с мезенхимальными стволовыми клетками, продуцирующими Tgfβ3

и Vmp2 [106], а в работе Sun et al. была показана эффективность инъекций стволовых клеток жировой ткани в комплексе с Tgfβ3 [107]. В настоящее время активно ведется разработка 3D-моделей скаффолда, способных обеспечить равномерное распределение стволовых клеток по всему объему матрикса и пролонгированное высво-

бождение активаторов хондрогенеза [108]. Удачным примером таких моделей является сочетание клеток стромальной васкулярной фракции с гидрогелем метакрилат-желатина, содержащим Tgf β 3, использованное для терапии поврежденного мениска [109].

Почти три десятилетия прошли с открытия рецепторов и сигнальных медиаторов белка Tgf β 3. В настоящее время механизм воздействия данных белков на рецепторы клеточной поверхности и активацию внутриклеточного сигналинга посредством белков семейства Smad, в целом, понятен. Взаимодействие Smad белков с транскрипционными факторами влияет на увеличение экспрессии генов коллагена II типа и агрекана, что приводит к увеличению синтеза внеклеточного матрикса гиалинового хряща. После открытия этого явления исследователи задумались об использовании белка Tgf β 3 в терапевтических целях для восстановления гиалинового слоя хрящевой поверхности. Появились работы по модификации клеточной культуры ММСК рекомбинантным белком Tgf β 3 для последующей дифференцировки и хондрогенной пролиферации как в экспериментах *in vitro* [105]. Следующим этапом стало применение в экспериментах на животных клеточно-инженерных конструкций с модифицированными ММСК для восстановления поврежденного слоя гиали-

нового хряща, что было показано Sun et al. [107], а также в наших собственных работах [17]. Применение данного цитокина для модификации клеточной культуры (как с помощью рекомбинантных белков, так и с помощью созданных плазмид, несущих ген данного белка), на наш взгляд, является перспективным направлением при создании КИК для замещения поверхностных дефектов гиалинового хряща. Однако такие работы требуют от исследователей детального понимания всех молекулярных механизмов и дозозависимости действия белка Tgf β 3 на культуру клеток и тщательного контроля её пролиферации.

Финансирование. Работа выполнена в рамках темы Государственного задания Института цитологии РАН при финансовой поддержке Минобрнауки России и при финансовой поддержке гранта СПбГУ ID 51140332.

Благодарности. Авторы благодарны за сотрудничество ресурсным центрам «ЦКП ХРОМАС», «Биобанк» и «РМиКТ» научного парка СПбГУ.

Конфликт интересов. Авторы статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Божокин М. С., Божкова С. А., Нетылько Г. И. (2016) Возможности современных клеточных технологий для восстановления поврежденного суставного хряща (аналитический обзор литературы), *Травматология и ортопедия России*, **22**, 122-134, doi: 10.21823/2311-2905-2016-22-3-122-134.
2. Sophia Fox, A. J., Bedi, A., and Rodeo, S. A. (2009) The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function, *Sports Health*, **1**, 461-468, doi: 10.1177/1941738109350438.
3. Божокин М. С., Божкова С. А., Нетылько Г. И., Румакин В. П., Наконечный Д. Г., Чепурненко М. Н. (2017) Морфофункциональная характеристика хондрорегенераторного процесса в экспериментальном локальном дефекте поверхности суставного хряща, *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, **8**, 302-306.
4. Maglio, M., Brogini, S., Pagani, S., Giavaresi, G., and Tschon, M. (2019) Current trends in the evaluation of osteochondral lesion treatments: histology, histomorphometry, and biomechanics in preclinical models, *Bio. Med. Research Intern.*, **2019**, 4040236, doi: 10.1155/2019/4040236.
5. Kurtz, S., Ong, K., Lau, E., Mowat, F., and Halpern, M. (2007) Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030, *J. Bone Jt. Surg. – Ser. A.*, **89**, 780-785, doi: 10.2106/JBJS.F.00222.
6. Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., and Peterson, L. (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation, *N. Engl. J. Med.*, **6**, 889-895, doi: 10.1056/NEJM199410063311401.
7. Xiang, Y., Bunpetch, V., Zhou, W., and Ouyang, H. (2019) Optimization strategies for ACL: a step-chronicle review, *J. Orthopaedic Transl.*, **17**, 3-14, doi: 10.1016/j.jot.2018.12.005.
8. Elmallah, R., Cherian, J., Jauregui, J., Pierce, T., Beaver, W., and Mont, M. (2015) Genetically modified chondrocytes expressing TGF- β 1: a revolutionary treatment for articular cartilage damage? *Expert Opin. Biol. Therapy*, **15**, 455-464, doi: 10.1517/14712598.2015.1009886.
9. Finnson, K., Chi, Y., Bou-Gharios, G., Leask, A., and Philip, A. (2012) TGF-beta signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis, *Front. Biosci. Sch.*, **1**, 251-268, doi: 10.2741/s266.
10. Jeuken, R., Roth, A., Peters, R., Van Donkelaar, C., Thies, J., Van Rhijn, L., and Emans, P. J. (2016) Polymers in cartilage defect repair of the knee: current status and future prospects, *Polymers*, **4**, 8, doi: 10.3390/polym8060219.
11. Plánka, L., Starý, D., Srnec, R., Necas, A., and Gál, P. (2008) New options for management of posttraumatic articular cartilage defects, *Rozhledy v Chirurgii: Měsíčník Československé Chirurgické Společnosti*, **87**, 1, 42-45.
12. Diederichs, S., Gabler, J., Autenrieth, J., Kynast, K., Merle, C., Walles, H., Utikal, J., and Richter, W. (2016)

- Differential regulation of SOX9 protein during chondrogenesis of induced pluripotent stem cells versus mesenchymal stromal cells: a shortcoming for cartilage formation, *Stem Cells Dev.*, **25**, 598-609, doi: 10.1089/scd.2015.0312.
13. Skuse, G., and Lamkin-Kennard, K. (2013) Reverse engineering life: physical and chemical mimetics for controlled stem cell differentiation into cardiomyocytes, *Methods Mol. Biol.*, **1001**, 99-114, doi: 10.1007/978-1-62703-363-3_9.
 14. Tokuda, S., and Yu, A. (2019) Regulation of epithelial cell functions by the osmolality and hydrostatic pressure gradients: a possible role of the tight junction as a sensor, *Intern. J. Mol. Sci.*, **20**, doi: 10.3390/ijms20143513.
 15. Vieira, H., Alves, P., and Vercelli, A. (2011) Modulation of neuronal stem cell differentiation by hypoxia and reactive oxygen species, *Prog. Neurobiol.*, **93**, 444-455, doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.01.007.
 16. Khamo, J., Krishnamurthy, V., Sharum, S., Mondal, P., and Zhang, K. (2017) Applications of optobiology in intact cells and multicellular organisms, *J. Mol. Biol.*, **429**, 2999-3017, doi: 10.1016/j.jmb.2017.08.015.
 17. Божокин М. С., Божкова С. А., Нетьлько Г. И., Наконечный Д. Г., Блинова М. И., Нащекина Ю. А. (2018) Результаты замещения поверхностного дефекта гиалинового хряща крысы клеточно-инженерной конструкцией в эксперименте, *Труды Карельского НИЦ РАН*, **4**, 13-22, doi: 10.17076/them815.
 18. Kuroda, Y., Kawai, T., Goto, K., and Matsuda, S. (2019) Clinical application of injectable growth factor for bone regeneration: a systematic review, *Inflamm. Regen.*, **39**, 1-10, doi: 10.1186/s41232-019-0109-x.
 19. Namann, A., Nguyen, A., and Pannier, A. (2019) Nucleic acid delivery to mesenchymal stem cells: a review of nonviral methods and applications, *J. Biol. Engin.*, **13**, 7, doi: 10.1186/s13036-019-0140-0.
 20. Oggu, G., Sasikumar, S., Reddy, N., Ella, K., Rao, C., and Bokara, K. (2017) Gene delivery approaches for mesenchymal stem cell therapy: strategies to increase efficiency and specificity, *Stem Cell Rev.*, **13**, 725-740, doi: 10.1007/s12015-017-9760-2.
 21. Hata, A., and Chen, Y. (2016) TGF-β signaling from receptors to smads, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, doi: 10.1101/cshperspect.a022061.
 22. Yang, X., Chen, L., Xu, X., Li, C., Huang, C., and Deng, C. (2001) TGF-β/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage, *J. Cell Biol.*, **153**, 35-46.
 23. Moses, H., Roberts, A., and Derynck, R. (2016) The discovery and early days of TGF-β: a historical perspective, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, doi: 10.1101/cshperspect.a021865.
 24. Derynck, R., and Budi, E. (2019) Specificity, versatility, and control of TGF-β family signaling, *Sci. Signal.*, **12**, 570, doi: 10.1126/scisignal.aav5183.
 25. De Larco, J., and Todaro, G. (1978) Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4001-4005.
 26. Todaro, G., De Larco, J., and Fryling, C. (1982) Sarcoma growth factor and other transforming peptides produced by human cells: interactions with membrane receptors, *Fed. Proc.*, **41**, 2996-3003.
 27. Kastin, A. (2013) *Handbook of Biologically Active Peptides*, Chapter 225, doi: 10.1016/C2010-0-66490-X.
 28. Assoian, R., Komoriya, A., Meyers, C., Miller, D., and Sporn, M. (1983) Transforming growth factor-β in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization, *J. Biol. Chem.*, **258**, 7155-7160.
 29. Frenkel, S., Saadeh, P., Mehrara, B., Chin, G., Steinbrech, D., Brent, B., Gittes, G., and Longaker, M. (2000) Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling, *Plast. Reconstr. Surg.*, **105**, 980-990, doi: 10.1097/00006534-200003000-00022.
 30. Reddi, A., and Cunningham, N. (1990) Bone induction by osteogenin and bone morphogenetic proteins, *Biomaterials*, **11**, 33-34.
 31. Glick, A., Weinberg, W., Wu, I., Quan, W., and Yuspa, S. (1996) Transforming growth factor beta 1 suppresses genomic instability independent of a G1 arrest, p53, and Rb, *Cancer Res.*, **56**, 3645-3650.
 32. Massagué, J. (1999) Wounding, Smad, *Nat. Cell. Biol.*, **1**, 117-119, doi: 10.1038/12944.
 33. Herpin, A., Lelong, C., and Favrel, P. (2004) Transforming growth factor-β-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans, *Dev. Comp. Immunol.*, **28**, 461-485, doi: 10.1016/j.dci.2003.09.007.
 34. Kwiatkowski, W., Gray, P., and Choe, S. (2014) Engineering TGF-β superfamily ligands for clinical applications, *Trends Pharmacol. Sci.*, **35**, 648-657, doi: 10.1016/j.tips.2014.10.006.
 35. Lu, Y., Boer, J., Barsova, R., Favorova, O., Goel, A., Müller, M., and Feskens, E. (2012) *TGFβ1* genetic polymorphisms and coronary heart disease risk: a meta-analysis, *BMC Med. Genet.*, **13**, 39, doi: 10.1186/1471-2350-13-39.
 36. Rao, K., Nagireddy, S., and Chakrabarti, S. (2011) Complex genetic mechanisms in glaucoma: an overview, *Ind. J. Ophthalm.*, **59**, 31-42, doi: 10.4103/0301-4738.73685.
 37. Leutermann, R., Sheikzadeh, S., Brockstädt, L., Rybczynski, M., van Rahden, V., Kutsche, K., von Kodolitsch, Y., and Rosenberger, G. (2014) A 1-bp duplication in *TGFβ2* in three family members with a syndromic form of thoracic aortic aneurysm, *Eur. J. Hum. Genet.*, **22**, 944-948, doi: 10.1038/ejhg.2013.252.
 38. Occlleston, N., Laverty, H., O'Kane, S., and Ferguson, M. (2008) Prevention and reduction of scarring in the skin by transforming growth factor beta 3 (TGFβ3): from laboratory discovery to clinical pharmaceutical, *J. Biomater. Sci., Polymer Edition*, **19**, 1047-1063, doi: 10.1163/156856208784909345.
 39. Gilbert, R., Vickaryous, M., and Vilorio-Petit, A. (2016) Signalling by transforming growth factor beta isoforms in wound healing and tissue regeneration, *J. Dev. Biol.*, **22**, 4, doi: 10.3390/jdb4020021.
 40. Furumatsu, T., Tsuda, M., Taniguchi, N., Tajima, Y., and Asahara, H. (2005) Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment, *J. Biol. Chem.*, **280**, 8343-8350, doi: 10.1074/jbc.M413913200.
 41. Yu, J., Shao, L., Lemas, V., Yu, A., Vaughan, J., Rivier, J., and Vale, W. (1987) Importance of FSH-releasing protein and inhibin in erythrodifferentiation, *Nature*, **330**, 765-767, doi: 10.1038/330765a0.
 42. Bloise, E., Ciarmela, P., Cruz, C., Luisi, S., Petraglia, F., and Reis, F. (2019) Activin A in mammalian physiology, *Physiol. Rev.*, **99**, 739-780, doi: 10.1152/physrev.00002.2018.
 43. Ling, N., Ying, S., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M., and Guillemin, R. (1986) Pituitary FSH is released by a heterodimer of the β-subunits from the two forms of inhibin, *Nature*, **321**, 779-782, doi: 10.1038/321779a0.
 44. Namwanje, M., and Brown, C. (2016) Activins and inhibins: roles in development, physiology, and disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, doi: 10.1101/cshperspect.a021881.
 45. Chin, D., Boyl, G., Parsons, P., and Coman, W. (2004) What is transforming growth factor-beta (TGF-β)? *Brit. J. Plastic Surg.*, **57**, 215-221, doi: 10.1016/j.bjps.2003.12.012.

46. Kushnir, V., Seifer, D., Barad, D., Sen, A., and Gleicher, N. (2017) Potential therapeutic applications of human anti-Müllerian hormone (AMH) analogues in reproductive medicine, *J. Assist. Reprod. Genet.*, **34**, 1105-1113, doi: 10.1007/s10815-017-0977-4.
47. Tabibzadeh, S., and Hemmati-Brivanlou, A. (2006) Lefty at the crossroads of "stemness" and differentiative events, *Stem Cells*, **24**, 1998-2006, doi: 10.1634/stemcells.2006-0075.
48. Jones, C., Kuehn, M., Hogan, B., Smith, J., and Wright, C. (1995) Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation, *Development*, **121**, 3651-3662.
49. Morikawa, M., Derynck, R., and Miyazono, K. (2016) TGF- β and the TGF- β family: context-dependent roles in cell and tissue physiology, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, 8, doi: 10.1101/cshperspect.a021873.
50. Papageorgis, P., and Stylianopoulos, T. (2015) Role of TGF β in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery (review), *Int. J. Oncol.*, **46**, 933-943, doi: 10.3892/ijco.2015.2816.
51. Gatzka, C., Oh, S., and Blobe, G. (2010) Roles for the type III TGF- β receptor in human cancer, *Cell. Signal.*, **22**, 1163-1174, doi: 10.1016/j.cellsig.2010.01.016.
52. Lawler, S., Feng, X., Chen, R., Maruoka, E., Turck, C., Griswold-Prenner, I., and Derynck, R. (1997) The type II transforming growth factor- β receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues, *J. Biol. Chem.*, **272**, 14850-14859, doi: 10.1074/jbc.272.23.14850.
53. Heldin, C., and Moustakas, A. (2016) Signaling receptors for TGF- β family members, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, 8, doi: 10.1101/cshperspect.a022053.
54. Ahmadi, A., Najafi, M., Farhood, B., and Mortezaee, K. (2019) Transforming growth factor- β signaling: tumorigenesis and targeting for cancer therapy, *J. Cell. Physiol.*, **234**, 12173-12187, doi: 10.1002/jcp.27955.
55. Wrana, J., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X., and Massagué, J. (1992) TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex, *Cell*, **71**, 1003-1014, doi: 10.1016/0092-8674(92)90395-S.
56. Yamashita, H., ten Dijke, P., Franzén, P., Miyazono, K., and Heldin, C. (1994) Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor- β , *J. Biol. Chem.*, **269**, 20172-20178.
57. Massagué, J. (1998) TGF-beta signal transduction, *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 753-791, doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.753.
58. Massagué, J., and Chen, Y. (2000) Controlling TGF-beta signaling, *Genes Dev.*, **14**, 627-644.
59. Feng, X., and Derynck, R. (2005) Specificity and versatility in tgf-beta signaling through smads, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **21**, 659-693, doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.022404.142018.
60. Huang, T., David, L., Mendoza, V., Yang, Y., Villarreal, M., De, K., Sun, L., Fang, X., López-Casillas, F., Wrana, J., and Hinck, A. (2011) TGF- β signalling is mediated by two autonomously functioning T β RI:T β RII pairs, *EMBO J.*, **30**, 1263-1276, doi: 10.1038/emboj.2011.54.
61. Atfi, A., Dumont, E., Colland, F., Bonnier, D., L'helgoualc'h, A., Prunier, C., Ferrand, N., Clément, B., Wewer, U., and Théret, N. (2007) The disintegrin and metalloproteinase ADAM12 contributes to TGF- β signaling through interaction with the type II receptor, *J. Cell Biol.*, **16**, 201-208, doi: 10.1083/jcb.200612046.
62. Kang, J., Liu, C., and Derynck, R. (2009) New regulatory mechanisms of TGF- β receptor function, *Trends Cell Biol.*, **19**, 385-394, doi: 10.1016/j.tcb.2009.05.008.
63. Imamura, T., Oshima, Y., and Hikita, A. (2013) Regulation of TGF- β family signalling by ubiquitination and deubiquitination, *J. Biochem.*, **154**, 481-489, doi: 10.1093/jb/mvt097.
64. Zuo, W., Huang, F., Chiang, Y., Li, M., Du, J., Ding, Y., Zhang, T., Lee, H., Jeong, L., Chen, Y., Deng, H., Feng, X., Luo, S., Gao, C., and Chen, Y. (2013) C-Cbl-mediated neddylation antagonizes ubiquitination and degradation of the TGF- β type II receptor, *Mol. Cell*, **49**, 499-510, doi: 10.1016/j.molcel.2012.12.002.
65. Zhang, L., Zhou, F., Drabsch, Y., Gao, R., Snaar-Jagalska, B., Mickanin, C., Huang, H., Sheppard, K., Porter, J., Lu, C., and Dijke, P. (2012) USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF- β type i receptor, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 717-726, doi: 10.1038/ncb2522.
66. Flotho, A., and Melchior, F. (2013) Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease, *Annu. Rev. Biochem.*, **82**, 357-385, doi: 10.1146/annurev-biochem-061909-093311.
67. Mu, Y., Sundar, R., Thakur, N., Ekman, M., Gudey, S., Yakymovych, M., Hermansson, A., Dimitriou, H., Bengoechea-Alonso, M., Ericsson, J., Heldin, C., and Landström, M. (2011) TRAF6 ubiquitinates TGF β type i receptor to promote its cleavage and nuclear translocation in cancer, *Nat. Commun.*, **2**, 330, doi: 10.1038/ncomms1332.
68. Li, S. B., and Jia-Fa Wu, J.-F. (2020) TGF- β /SMAD Signaling regulation of mesenchymal stem cells in adipocyte commitment, *Rev. Stem Cell Res. Therl.*, **11**, 41, doi: 10.1186/s13287-020-1552-y.
69. Nishita, M., Ueno, N., and Shibuya, H. (1999) Smad8B, a Smad8 splice variant lacking the SXS site that inhibits Smad8-mediated signaling, *Genes Cells*, **4**, 583-591, doi: 10.1046/j.1365-2443.1999.00285.x.
70. Hill, C. (2009) Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins, *Cell Res.*, **19**, 36-46, doi: 10.1038/cr.2008.325.
71. Wu, M., Chen, G., and Li, Y. (2016) TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease, *Bone Res.*, **4**, 16009, doi: 10.1038/boneres.2016.9.
72. Kang, J., Alliston, T., Delston, R., and Derynck, R. (2014) Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3, *EMBO J.*, **24**, 2543-2555.
73. Massagué, J. (2014) TGFbeta signalling in context, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 616-630, doi: 10.1038/nrm3434.
74. Zhang, S., Fei, T., Zhang, L., Zhang, R., Chen, F., Ning, Y., Han, Y., Feng, X., Meng, A., and Chen, Y. (2007) Smad7 antagonizes transforming growth factor signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation, *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 4488-4499, doi: 10.1128/mcb.01636-06.
75. Gu, W., Monteiro, R., Zuo, J., Simões, F., Martella, A., Andrieu-Soler, C., Grosveld, F., Sauka-Spengler, T., and Patient, R. (2015) A novel TGF β modulator that uncouples R-Smad/I-Smad-mediated negative feedback from R-Smad/ligand-driven positive feedback, *PLoS Biol.*, **13**, doi: 10.1371/journal.pbio.1002051.
76. Thielen, N., van der Kraan, P., and van Caam, A. (2019) TGF β /BMP signaling pathway in cartilage homeostasis, **8**, 9, doi: 10.3390/cells8090969.
77. Li, Y., Luo, W., and Yang, W. (2018) Nuclear transport and accumulation of Smad proteins studied by single-molecule microscopy, *Biophys. J.*, **114**, 2243-2251 doi: 10.1016/j.bpj.2018.03.018.
78. Jin, Q., Gao, G., and Mulder, K. (2009) Requirement of a dynein light chain in TGF β /Smad3 signaling, *J. Cell. Physiol.*, **221**, 707-715, doi: 10.1002/jcp.21910.

79. Batut, J., Howell, M., and Hill, C. (2007) Kinesin-mediated transport of Smad2 is required for signaling in response to TGF-β ligands, *Dev. Cell.*, **12**, 261-274, doi: 10.1016/j.devcel.2007.01.010.
80. Massagué, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005) Smad transcription factors, *Genes Dev.*, **19**, 2783-2810, doi: 10.1101/gad.1350705.
81. Hill, C. (2016) Transcriptional control by the SMADs, *Cold Spring Harbor Persp. Biol.*, **8**, doi: 10.1101/cshperspect.a022079.
82. Qiao, B., Padilla, S., and Benya, P. (2005) Transforming growth factor (TGF)-β-activated kinase 1 mimics and mediates TGF-β-induced stimulation of type II collagen synthesis in chondrocytes independent of Col2a1 transcription and Smad3 signaling, *J. Biol. Chem.*, **280**, 17562-17571, doi: 10.1074/jbc.M500646200.
83. Bhogal, R., Stoica, C., McGaha, T., and Bona, C. (2005) Molecular aspects of regulation of collagen gene expression in fibrosis, *J. Clin. Immunol.*, **25**, 592-603, doi: 10.1007/s10875-005-7827-3.
84. Bell, D., Leung, K., Wheatley, S., Ng, L., Zhou, S., Ling, K., Sham, M., Koopman, P., Tam, P., and Cheah, K. (1997) SOX9 directly regulates the type-II collagen gene, *Nat. Genet.*, **16**, 174-178, doi: 10.1038/ng0697-174.
85. Sen, R., Pezoa, S., Carpio, Shull, L., Hernandez-Lagunas, L., Niswander, L., and Artinger, K. (2018) Kat2a and Kat2b acetyltransferase activity regulates craniofacial cartilage and bone differentiation in Zebrafish and mice, *J. Dev. Biol.*, **12**, doi: 10.3390/jdb6040027.
86. Chen, X., Huang, H., Wang, H., Guo, F., Du, X., Ma, L., Zhao, L., Pan, Z., Gui, H., Yuan, T., Liu, X., Song, L., Wang, Y., He, J., Lei, H., and Gao, R. (2014) Characterization of zebrafish pax1b and pax9 in fin bud development, *Biomed Res. Int.*, **2014**, 309385, doi: 10.1155/2014/309385.
87. Seoane, J., Le, H., Shen, L., Anderson, S., and Massagué, J. (2004) Integration of smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation, *Cell*, **117**, 211-223, doi: 10.1016/S0092-8674(04)00298-3.
88. Naka, K., Hoshii, T., Muraguchi, T., Tadokoro, Y., Ooshio, T., Kondo, Y., Nakao, S., Motoyama, N., and Hirao, A. (2010) TGF-β-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia, *Nature*, **463**, 676-680, doi: 10.1038/nature08734.
89. Kang, Y., Chen, C., and Massagué, J. (2003) A self-enabling TGFβ response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells, *Mol. Cell*, **11**, 915-926, doi: 10.1016/S1097-2765(03)00109-6.
90. Vincent, T., Neve, E., Johnson, J., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P., Crystal, R., de Herreros, A., Moustakas, A., Pettersson, R., and Fuxe, J. (2009) A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-β mediated epithelial-mesenchymal transition, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 943-950, doi: 10.1038/ncb1905.
91. Pardali, K., Kurisaki, A., Morén, A., ten Dijke, P., Kardassis, D., and Moustakas, A. (2000) Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21Waf1/Cip1 regulation by transforming growth factor-β, *J. Biol. Chem.*, **275**, 29244-29256, doi: 10.1074/jbc.M909467199.
92. Baugé, C., Cauvard, O., Leclercq, S., Galéra, P., and Boumédiène, K. (2011) Modulation of transforming growth factor beta signalling pathway genes by transforming growth factor beta in human osteoarthritic chondrocytes: Involvement of Sp1 in both early and late response cells to transforming growth factor beta, *Arthritis Res. Ther.*, **13**, 23, doi: 10.1186/ar3247.
93. Blaney Davidson, E., Remst, D., Vitters, E., van Beuningen, H., Blom, A., Goumans, M., van den Berg, W., and van der Kraan, P. (2009) Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice, *J. Immunol.*, **182**, 7937-7945, doi: 10.4049/jimmunol.0803991.
94. Siomi, H., and Siomi, M. (2010) Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals, *Mol. Cell*, **38**, 323-332, doi: 10.1016/j.molcel.2010.03.013.
95. Ha, M., and Kim, V. (2014) Regulation of microRNA biogenesis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 509-524, doi: 10.1038/nrm3838.
96. Blahna, M., and Hata, A. (2012) Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis, *FEBS Lett.*, **586**, 1906-1912, doi: 10.1016/j.febslet.2012.01.041.
97. Zhang, Y., Huang, X., and Yuan, Y. (2017) MicroRNA-410 promotes chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells through down-regulating Wnt3a, *Am. J. Transl. Res.*, **9**, 136-145.
98. Lee, S., Yoon, D., Paik, S., Lee, K., Jang, Y., and Lee, J. (2014) MicroRNA-495 Inhibits chondrogenic differentiation in human mesenchymal stem cells by targeting Sox9, *Stem Cells Dev.*, **23**, 1798-1808, doi: 10.1089/scd.2013.0609.
99. Crecente-Campo, J., Borrajo, E., Vidal, A., and Garcia-Fuentes, M., (2017) New scaffolds encapsulating TGF-β3/BMP-7 combinations driving strong chondrogenic differentiation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **114**, 69-78, doi: 10.1016/j.ejpb.2016.12.021.
100. Wang, J., Sun, B., Tian, L., He, X., Gao, Q., Wu, T., Ramakrishna, S., Zheng, J., and Mo, X. (2017) Evaluation of the potential of rhTGF-β3 encapsulated P(LLA-CL)/collagen nanofibers for tracheal cartilage regeneration using mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of human umbilical cord, *Mater. Sci. Eng.*, **70**, 637-645, doi: 10.1016/j.msec.2016.09.044.
101. Yanagawa, Y., Hiraide, S., and Iizuka, K. (2016) Isoform-specific regulation of transforming growth factor-β mRNA expression in macrophages in response to adrenoceptor stimulation, *Microbiol. Immunol.*, **60**, 56-63. doi: 10.1111/1348-0421.12344.
102. Frangogiannis, N. G. (2017) The role of transforming growth factor (TGF)-β in the infarcted myocardium, *J. Thor. Dis.*, **9**, 52-63, doi: 10.21037/jtd.2016.11.19.
103. Luo, Z., Jiang, L., Xu, Y., Li, H., Xu, W., Wu, S., Wang, Y., Tang, Z., Lv, Y., and Yang, L. (2015) Mechano growth factor (MGF) and transforming growth factor (TGF)-β3 functionalized silk scaffolds enhance articular hyaline cartilage regeneration in rabbit model, *Biomaterials*, **52**, 463-475, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.01.001.
104. Yang, S. S., Jin, L. H., Park, S. H., Kim, M. S., Kim, Y. J., Choi, B. H., Lee, C. T., Park, S. R., and Min, B. H. (2016) Extracellular matrix (ECM) multilayer membrane as a sustained releasing growth factor delivery system for rhTGF-β3 in articular cartilage repair, *PLoS One*, **11**, e0156292, doi: 10.1371/journal.pone.0156292.
105. Yang, Q., Teng, B. H., Wang, L. N., Li, K., Xu, C., Ma, X. L., Zhang, Y., Kong, D. L., Wang, L. Y., and Zhao, Y. H. (2017) Silk fibroin/cartilage extracellular matrix scaffolds with sequential delivery of TGF-β3 for chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells, *Int. J. Nanomed.*, **12**, 6721-6733, doi: 10.2147/IJN.S141888.
106. Wang, X., Li, Y., Han, R., He, C., Wang, G., Wang, J., Zheng, J., Pei, M., and Wei, L. (2014) Demineralized bone matrix combined bone marrow mesenchymal stem cells, bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-β3 gene promoted pig cartilage defect repair, *PLoS One*, **9**, e116061, doi: 10.1371/journal.pone.0116061.

107. Sun, Q., Zhang, L., Xu, T., Ying, J., Xia, B., Jing, H., and Tong, P. (2018) Combined use of adipose derived stem cells and TGF- β 3 microspheres promotes articular cartilage regeneration *in vivo*. *Biotech. Histochem.*, **93**, 168-176, doi: 10.1080/10520295.2017.1401663.
108. Zhou, M., Lozano, N., Wychowanec, J. K., Hodgkinson, T., Richardson, S. M., Kostarelos, K., and Hoyland, J. A. (2019) Graphene oxide: a growth factor delivery carrier to enhance chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in 3D hydrogels, *Acta Biomater.*, **96**, 271-280, doi: 10.1016/j.actbio.2019.07.027.
109. Rothrauff, B., Sasaki, H., Kihara, S., Overholt, K., Gottardi, R., Lin, H., Fu, F., Tuan, R., and Alexander, P. (2019) Point-of-care procedure for enhancement of meniscal healing in a goat model utilizing infrapatellar fat pad-derived stromal vascular fraction cells seeded in photocrosslinkable hydrogel, *Am. J. Sports Med.*, **47**, 3396-3405, doi: 10.1177/0363546519880468.

EVALUATION OF Tgf β 3 CYTOKINE MECHANISM OF ACTION AS A THERAPEUTIC AGENT FOR INCREASING SYNTHESIS OF EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS IN HYALINE CARTILAGE

Review

M. S. Bozhokin^{1,2*}, Y. V. Sopova^{3,4,5}, D. V. Kachkin^{4,5}, A. A. Rubel^{4,5}, and M. G. Khotin²

¹ Russian Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after R. R. Vreden, 195427 St. Petersburg, Russia; E-mail: writeback@mail.ru

² Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, 194064 St. Petersburg, Russia

³ St. Petersburg subsidiary of Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Science, 199034 St. Petersburg, Russia

⁴ St. Petersburg State University, Faculty of Biology, 199034 St. Petersburg, Russia

⁵ St. Petersburg State University, Faculty of Biology, Laboratory of Amyloid Biology, 199034 St. Petersburg, Russia

Received January 4, 2020

Revised February 26, 2020

Accepted February 26, 2020

Hyaline cartilage is forming a nonvascular connective tissue of the joints surface, consisting mostly from extracellular matrix proteins and a small number of highly differentiated chondrocytes cells. Nowadays are investigated a various techniques for repairing a joint surfaces damages, for example, the using of modified cell culture and biodegradable scaffolds. Molecular mechanisms of cartilage tissue proliferation are being actively studied during recent years. One of the most important proteins among cytokines and growth factors affecting the chondrogenesis is Tgf β 3, which plays a critical role in normal cartilage tissue proliferation. Via direct interaction with ligands on the surface of cell membrane, Tgf β 3 triggers a cascade of molecular interactions involving transcription factor Sox9. In this review we study the effect of Tgf β 3 on the receptor complex activation and subsequent intracellular movement of the associated Smad mediators. An analysis and the relation of these processes and a major extracellular matrix genes, such as *col2a1* and *acan* expression increase is also presented.

Keywords: Tgf β 3, mechanism of action, hyaline cartilage, Smad proteins, extracellular matrix