© Коллектив авторов, 2020

Муругина Н.Е.¹, Будихина А.С.¹, Муругин В.В.¹, Селезнева Е.М.²,
Чкадуа Г.З.³, Пашенков М.В.¹**Роль NF-κB в развитии синергического ответа макрофагов человека на сочетанную стимуляцию рецепторов NOD1 и TLR4 *in vitro***¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119991, г. Москва, Российская Федерация³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478, г. Москва, Российская Федерация**Резюме**

Введение. При сочетанной активации макрофагов агонистами рецепторов NOD1 и TLR4 наблюдается синергическое усиление экспрессии цитокинов: ответ клеток на сочетание агонистов выше, чем сумма ответов на каждый агонист по отдельности. Важнейшую роль в индукции экспрессии цитокинов при стимуляции NOD1 и TLR4 играют факторы транскрипции семейства NF-κB.

Цель работы – изучить характер активации NF-κB-зависимого сигнального пути в макрофагах при одновременном добавлении агонистов NOD1 и TLR4, сравнить кинетику активации NF-κB-зависимого сигнального пути с кинетикой экспрессии мРНК *TNF* и *IL6*.

Материал и методы. Макрофаги получали из моноцитов крови здоровых доноров и стимулировали их агонистом NOD1 (N-ацетил-D-мурамил-L-аланил-D-изоглутамил-мезо-диаминопимелиновой кислотой), агонистом TLR4 (липополисахаридом) и их сочетанием, мРНК *TNF* и *IL6* определяли с помощью ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией; уровни белков NF-κB в ядре, а также уровни ингибиторного белка IκBα в цитоплазме и в ядре – с помощью вестерн-блоттинга.

Результаты. Показано, что транслокация белков NF-κB (p65/RelA, c-Rel, p50) в ядро в первые 4 ч сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4 носит несинергический характер. Однако на выходе из ядра после 150-й минуты сочетанной стимуляции наблюдается синергическое усиление экспрессии мРНК *TNF* и *IL6*. Рассматривается возможный вклад относительного дефицита IκBα в ядре в формирование синергического эффекта.

Заключение. Синергическое усиление экспрессии цитокинов при одновременной активации NOD1 и TLR4 не объясняется синергической активацией NF-κB-зависимого сигнального пути.

Ключевые слова: макрофаги; NOD1; TLR4; синергизм; NF-κB; фактор некроза опухолей

Статья поступила 07.02.2020. Принята в печать 20.02.2020.

Для цитирования: Муругина Н.Е., Будихина А.С., Муругин В.В., Селезнева Е.М., Чкадуа Г.З., Пашенков М.В. Роль NF-κB в развитии синергического ответа макрофагов человека на сочетанную стимуляцию рецепторов NOD1 и TLR4 *in vitro*. Иммунология. 2020, 41 (2): 114–123. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-114-123

Финансирование. Работа поддержана грантом Российского научного фонда №16-15-10314.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Murugina N.E.¹, Budikhina A.S.¹, Murugin V.V.¹, Selezneva E.M.²,
Chkadua G.Z.³, Pashenkov M.V.¹**The role of NF-κB in the synergistic response of human macrophages to combined stimulation of NOD1 and TLR4 receptors *in vitro***

Для корреспонденции
Пашенков Михаил Владимирович –
доктор медицинских наук,
и.о. заведующего лабораторией
клинической иммунологии
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России, Москва,
Российская Федерация
E-mail: mvpashenkov@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6995-1790>

¹ National Research Center – Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russian Federation

³ N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 115478, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. Stimulation of macrophages by a combination of NOD1 and TLR4 receptor agonists results in a synergistic enhancement of cytokine expression: cellular response to the combination of agonist is greater than the sum of responses to each individual agonist. A central role in NOD1- and TLR4-dependent cytokine expression belongs to the NF-κB family of transcription factors.

Aims – to investigate the mode of activation of NF-κB-dependent signaling pathway in macrophages upon their treatment with a combination of NOD1 and TLR4 agonists, to compare kinetics of NF-κB pathway activation with kinetics of *TNF* and *IL6* mRNA expression.

Material and methods. Macrophages were obtained from blood monocytes of healthy donors and stimulated with NOD1 agonist (N-acetyl-D-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-meso-diaminopimelic acid), TLR4 agonist (lipopolysaccharide) and their combination. *TNF* and *IL6* mRNA were determined by reverse-transcription real-time PCR, levels of NF-κB proteins in the nucleus and of IκBα in the cytoplasm and in the nucleus by Western blotting.

Results. Translocation of NF-κB proteins (p65/RelA, c-Rel, p50) to the nucleus during the first 4 h of combined NOD1 and TLR4 stimulation is not synergistic. However, at the output of the nucleus, a synergistic enhancement of *TNF* and *IL6* mRNA expression is observed after 150 minutes of combined receptor stimulation. We consider possible role of relative deficiency of nuclear IκBα in the development of the synergistic response.

Conclusion. Synergistic enhancement of cytokine expression upon simultaneous NOD1 and TLR4 activation is not explained by synergistic activation of the NF-κB-dependent signaling pathway.

Keywords: macrophages; NOD1; TLR4; synergy; NF-κB; tumor necrosis factor

Received 07.02.2020. Accepted 20.02.2020.

For citation: Murugina N.E., Budikhina A.S., Murugin V.V., Selezneva E.M., Chkadua G.Z., Pashenkov M.V. The role of NF-κB in the synergistic response of human macrophages to combined stimulation of NOD1 and TLR4 receptors *in vitro*. *Immunologiya*. 2020; 41 (2): 114–23. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-114-123 (in Russian)

Funding. The study was supported by the grant of Russian Science Foundation No. 16-15-10314.

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

For correspondence

Mikhail V. Pashenkov –
MD, PhD, Deputy Head
of Clinical Immunology Laboratory,
NRC Institute of Immunology,
FMBA of Russia, Moscow,
Russian Federation
E-mail: mvpashenkov@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6995-1790>

Введение

Представители семейства Toll-подобных рецепторов (TLR), а также рецепторы NOD1 и NOD2 из семейства NOD-подобных рецепторов являются основными сенсорами бактериальных патогенов в клетках врожденной иммунной системы. Ведущую роль в узнавании грам-отрицательных бактерий играют два рецептора: NOD1, распознающий фрагменты пептидогликана (мурамилпептиды) [1, 2], и TLR4, распознающий липополисахарид (ЛПС) [3]. NOD1 и TLR4 находятся, соответственно, в цитозоле и на поверхностной мембране клеток врожденной иммунной системы.

Известно, что рецепторы NOD1 и NOD2 синергически взаимодействуют с TLR как *in vitro*, так и *in vivo* [4–8]. Ответ клеток на стимуляцию агонистом NOD1 или NOD2 в сочетании с агонистом какого-либо TLR, как правило, превышает сумму ответов на каждый агонист по отдельности [9]. Предполагается, что гиперпродукция цитокинов, вызванная синергическими взаимодействиями рецепторов, может приводить

к жизнеугрожающему системному воспалительному ответу, лежащему в основе сепсиса и септического шока [8]. С другой стороны, контролируемые синергические взаимодействия рецепторов могут быть использованы в терапевтических целях для повышения резистентности организма против патогенов [10]. Несмотря на то что феномен синергического взаимодействия NOD-рецепторов и TLR достаточно хорошо описан, его механизмы до сих пор не раскрыты, хотя такие попытки предпринимались [11–15].

Ключевую роль в реализации биологических эффектов NOD-рецепторов и TLR играют факторы транскрипции семейства NF-κB [16, 17]. Это семейство включает пять белков: p105/p50, p65 (RelA), RelB, c-Rel и p100/p52 [16]. В неактивированных клетках белки NF-κB находятся в цитоплазме в виде димеров, связанных с ингибиторными белками семейства IκB. Сигнальные пути как от NOD-рецепторов, так и от TLR приводят к активации киназы IKK (IκB kinase), которая фосфорилирует белки IκB, что является пусковым сигналом для

их протеасомной деградации [12, 18–20]. Освободившись от связи с IκB, димеры NF-κB поступают в ядро, где связываются с промоторами более 500 генов врожденного иммунного ответа, регулируя их экспрессию. Описанная последовательность событий составляет суть так называемого канонического пути активации NF-κB, в котором участвуют белки p105/p50, p65, c-Rel и RelB [16]. При этом различные по составу димеры по-разному влияют на транскрипцию мРНК: за активацию транскрипции отвечают гомо- и гетеродимеры, содержащие p65 и c-Rel, тогда как гомодимеры p50:p50 обладают ингибирующим действием [16, 21]. Ключевую роль в неканоническом пути активации NF-κB играет белок p100/p52. Этот сигнальный путь участвует в сравнительно поздних этапах активации клетки агонистами NOD- и TLR-рецепторов [22].

Поскольку сигнальные пути от NOD-рецепторов и TLR сходятся на киназе IKK, предпринимались попытки объяснить синергическое взаимодействие NOD-TLR синергической активацией этой киназы. По данным D.W. Abbott и соавт., при сочетанной стимуляции рецепторов NOD2 и TLR2 в моноцитоподобных клетках THP-1 наблюдается более мощная и продолжительная активация IKK и, как следствие, более быстрая и более полная деградация белка IκBα – основного представителя семейства IκB [23]. Тем не менее, непонятно, почему схождение сигнальных путей на киназе IKK должно приводить именно к ее синергической активации: простая логика подсказывает, что каждый из сигнальных путей будет активировать определенную часть общего пула IKK, что будет вести в лучшем случае к суммации эффектов, а не к синергизму. Действительно, по данным другой работы, при сочетанной стимуляции клеток THP-1 агонистами NOD2 и TLR4 в течение 20 мин уровни фосфорилированных белков IKKα/β (каталитических субъединиц IKK) и фосфорилированного IκBα суммируются, но синергических эффектов на этом уровне не наблюдается [11].

Транслокация белков NF-κB в ядро во многих случаях не является разовым событием, а носит колебательный характер [24, 25]. Колебания особенно характерны для ответа клеток на ФНО, но возможны и при стимуляции TLR [24, 25]. Формирование колебаний обусловлено, в частности тем, что ген *NFKBIA*, кодирующий ингибиторный белок IκBα, сам является NF-κB-индуцибельным. Первая волна поступления NF-κB в ядро индуцирует синтез IκBα *de novo*. Этот IκBα тоже поступает в ядро, способствуя отделению белков NF-κB от промоторов и их экспорту из ядра, что ведет к ослаблению NF-κB-зависимого сигнала и к уменьшению синтеза IκBα. В результате транслокация NF-κB в ядро вновь усиливается. Предполагается, что параметры колебаний, в частности их период и амплитуда, могут нести биологическую информацию, то есть определять параметры ответа клеток [25–27]. При этом колебания, возникающие в результате активации различных сигнальных путей, могут суммироваться, что тоже влияет на параметры ответа [24]. Неизвестно, может ли меха-

низм суммации колебаний приводить к формированию синергических эффектов NOD-TLR.

В предыдущей работе мы показали, что при сочетанной стимуляции макрофагов человека агонистами рецепторов NOD1 и TLR4 имеет место синергическое усиление экспрессии мРНК *TNF*, *IL6* и *IL1B*, причем синергический эффект формируется в период между 1 и 4 ч после добавления агонистов [28]. В настоящей работе изучены несколько ключевых показателей, характеризующих последовательные стадии активации системы NF-κB в макрофагах человека под действием агониста NOD1, агониста TLR4 и их сочетания. В частности, детально проанализирована кинетика деградации IκBα, транслокации факторов транскрипции p50, p65 и c-Rel в ядро, экспрессии мРНК *TNF*, *IL6* и *NFKBIA*. Показано, что вплоть до стадии транслокации NF-κB в ядро взаимодействие сигналов от рецепторов NOD1 и TLR4 не является синергическим. Однако на выходе из ядра формируется синергический ответ в виде взаимного усиления экспрессии мРНК цитокинов.

Материал и методы

Агонисты рецепторов NOD1 и TLR4. Агонист NOD1 – N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамил-мезодиаминопимелиновая кислота (М-триДАП) – был закуплен у Invivogen (США), липополисахарид (ЛПС) *E. coli* штамм O111:B4 – у Merck Millipore (США).

Получение и стимуляция макрофагов. Все кинетические эксперименты выполнены на культурах макрофагов от трех различных клинически здоровых доноров мужского пола в возрасте 20–50 лет. Исследования проводили согласно Хельсинкской декларации ВМА 2000 г. и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Исследование было одобрено локальным комитетом по этике. От всех доноров в отделении трансплантации костного мозга ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России были получены продукты лейкофереза. Макрофаги получали путем 6-суточного культивирования моноцитов, выделенных из продуктов лейкофереза, с рекомбинантным гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором человека (Miltényi Biotec, Германия), как описано ранее [28, 29]. Стимуляцию макрофагов проводили в 24-луночных планшетах (SPL Life Sciences, Республика Корея) путем добавления М-триДАП (10 мкг/мл), ЛПС (10 нг/мл) и их сочетания. По данным предыдущих экспериментов, М-триДАП и ЛПС в указанных концентрациях оказывают выраженное синергическое действие на экспрессию цитокинов макрофагами [28]. Через необходимые промежутки времени собирали клеточные лизаты и супернатанты. Контролем служили нестимулированные клетки, инкубированные в течение того же времени.

Выделение ядерной и цитозольной фракции. Образцы ядерной и цитозольной фракции получали каждые 15 мин в течение 210 мин после добавления агонистов. К клеточному монослою, отмытому холодным

фосфатно-солевым буфером (ФСБ), добавляли гипотонический буфер, содержащий коктейль ингибиторов протеаз (Sigma, США). Планшет инкубировали на льду 12 мин, периодически покачивая. Добавляли Нонидет Р-40 (Amresco, США) до конечной концентрации 0,6 %, инкубировали еще 30 с, затем интенсивно пипетировали клеточные лизаты. Ядра осаждали путем центрифугирования при 2000 g, отбирали надосадок (цитозольную фракцию) и добавляли к нему 1/5 объема 6-кратного буфера для образцов (10 % додецилсульфат натрия, 30 % глицерин, 0,6 М дитиотреитол, 0,012 % бромфеноловый синий, 0,3 М Трис, pH 6,8). Осадок ядер отмывали однократно гипотоническим буфером с ингибиторами протеаз (см. выше), после чего лизировали в 1-кратном буфере для образцов. Все образцы прогревали в течение 5 мин при 90 °С, после чего анализировали с помощью вестерн-блоттинга.

Вестерн-блоттинг. Методика подробно описана ранее [29]. Кроличьи поликлональные и моноклональные антитела (МкАт) к p65/RelA, c-Rel, p105/p50, p100/p52, IκBα и гистону H3 были закуплены у фирмы Cell Signaling Technologies (США), мышинные МкАт к α-тубулину (клон DM1A) – у фирмы Novus Biologicals (США). Гистон H3 и α-тубулин использовали как контроли загрузки, соответственно, для ядерной и цитозольной фракции; наряду с этим, отсутствие α-тубулина в ядерной фракции и отсутствие гистона H3 в цитозольной фракции служило критерием их чистоты.

Исследование экспрессии генов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) обратного транскрипта в реальном времени (ПЦР-РВ). Образцы собирали каждые 30 мин в течение 240 мин после добавления агонистов. Тотальную РНК выделяли с помощью наборов реактивов фирмы Jena Bioscience (Германия). Экспрессию мРНК *TNF*, *IL6* и *NFKB1A* в макрофагах анализировали с помощью ПЦР-РВ с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green, как описано ранее [29]. Для детекции мРНК *NFKB1A* использовали следующие праймеры: 5'-AAGCAGCAGCTCACCGAG-3' (прямой) и 5'-ACAGCCAAGTGGAGTGGAG-3' (обратный). Относительную экспрессию (ОЭ) генов рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Референс-образцами, в которых ОЭ приравнивалась к 1, служили нестимулированные клетки данного донора в точке 30 мин. В качестве нормировочного гена использовали *GAPDH*.

Обработка данных и статистический анализ. Площади под кривыми «время–ответ» (AUC) вычисляли по методу трапеций. Площадь под кривой считали площадь между кривой ответа на агонист и кривой изменения данного показателя в нестимулированных клетках. Чтобы оценить взаимодействие двух агонистов, для каждого измеряемого или вычисляемого показателя рассчитывали индексы синергизма (ИС) по формуле:

$$\text{ИС} = \frac{\text{Ответ}_{\text{М-триДАП+ЛПС}}}{(\text{Ответ}_{\text{М-триДАП}} + \text{Ответ}_{\text{ЛПС}})}.$$

Взаимодействие считали: а) синергическим при $\text{ИС} > 1$ с достоверностью $p < 0,05$ в *t*-тесте Стьюдента;

б) аддитивным при отсутствии достоверного отличия ИС от 1 (простая сумма эффектов агонистов); в) инфра-аддитивным, если эффект сочетания агонистов был меньше, чем сумма эффектов одиночных агонистов ($\text{ИС} < 1$ при $p < 0,05$), но не меньше, чем эффект любого из одиночных агонистов. Для статистического анализа использовали программы GraphPad Instat 3.06 и GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США).

Результаты

Кинетика экспрессии мРНК *TNF* и *IL6*

На первом этапе работы уточнили кинетику экспрессии мРНК *TNF* и *IL6* макрофагами в первые 4 ч стимуляции М-триДАП, ЛПС и их сочетанием. В присутствии М-триДАП и ЛПС уровень мРНК *TNF* достигал максимума, соответственно, через 120 ± 30 мин и 100 ± 17 мин после начала стимуляции, а в последующем снижался, оставаясь к исходу 4 ч значительно выше базальных значений (рис. 1А, табл. 1). Накопление мРНК *TNF* при стимуляции М-триДАП несколько запаздывало по сравнению с таковым при стимуляции ЛПС (см. рис. 1А). Вероятно, это обусловлено различиями в субклеточной локализации соответствующих рецепторов, из-за чего агонистам NOD1 требуется больше времени для достижения своего рецептора, чем агонистам TLR4. При сочетанной стимуляции уровни мРНК *TNF* вплоть до 90-й минуты не отличались от таковых при стимуляции ЛПС, но со 120-й мин становились достоверно выше, чем при стимуляции ЛПС (см. рис. 1А). Максимум экспрессии мРНК *TNF* при сочетанной стимуляции достигался через 150 ± 30 мин, что достоверно позже, чем при стимуляции ЛПС (см. табл. 1). Далее вплоть до конца опыта уровень мРНК *TNF* при сочетанной стимуляции находился на плато. Достоверный синергический эффект ($\text{ИС} > 1$ при $p < 0,05$) регистрировался со 150-й минуты включительно (рис. 1Б). Таким образом, особенность экспрессии мРНК *TNF* при сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4 состоит в продолжающемся накоплении мРНК *TNF* между 90 и 150-й минутами после начала стимуляции.

Схожие тенденции имели место и для мРНК *IL6* (рис. 1В, Г), с той разницей, что экспрессия мРНК *IL6* достигала максимальных значений позже, чем экспрессия мРНК *TNF* (см. табл. 1). Таким образом, подтверждены и уточнены сроки развития синергического эффекта NOD1-TLR4, описанные в предыдущей работе [28].

Кинетика транслокации белков семейства NF-κB в ядро

Белки NF-κB являются важнейшими регуляторами экспрессии *TNF* и *IL6* [30, 31]. Поскольку транслокация NF-κB в ядро может носить колебательный характер [24, 25], то уровни p65, c-Rel и p50 в ядрах макрофагов определяли с минимальными (15-минутными) интервалами в течение 3,5 ч после начала стимуляции. В исследуемом периоде, как правило, наблюдалась единствен-

Таблица 1. Время (в мин) от добавления агонистов до достижения максимальных ($T_{\max}$) и минимальных ($T_{\min}$) значений указанных показателей в макрофагах в зависимости от условий стимуляции

Показатель		1 М-триДАП	2 ЛПС	3 М-триДАП+ЛПС	P_{1-2}	P_{1-3}	P_{2-3}
мРНК <i>TNF</i>	$T_{\max}$	120 ± 30	100 ± 17	150 ± 30	0,187	0,144	0,033
мРНК <i>IL6</i>	$T_{\max}$	190 ± 46	180 ± 46	220 ± 17	0,415	0,174	0,165
p65 в ядре	$T_{\max}$	75 ± 15	55 ± 9	40 ± 9	0,058	0,012	0,05
c-Rel в ядре	$T_{\max}$	90 ± 26	50 ± 17	90 ± 30	0,045	0,500	0,058
p50 в ядре	$T_{\max}$	110 ± 53	60 ± 15	75 ± 30	0,095	0,187	0,241
IkBα в цитоплазме	$T_{\min}$	45 ± 26	25 ± 9	25 ± 9	0,137	0,137	0,500
	$T_{\max}$	200 ± 17	210	175 ± 7	0,187	0,045	0,001
IkBα в ядре	$T_{\max}$	205 ± 9	210	195 ± 15	0,187	0,187	0,079

ная «волна» ядерной транслокации p65, c-Rel и p50, независимо от вида стимула (рис. 2А, В, Д), в некоторых случаях – возможно, начало второй «волны», выходящей за временные рамки эксперимента (см. рис. 2В).

При стимуляции ЛПС уже на 15-й мин уровни p65, c-Rel и p50 в ядре были многократно повышены по сравнению с базальными (см. рис. 2А, В, Д). Как видно из табл. 1, максимальные уровни p65, c-Rel и p50 при стимуляции ЛПС достигались через 50–60 мин после начала стимуляции (на 40–50 мин раньше, чем достигался пик мРНК *TNF*) с последующим снижением, более вы-

раженным для p65 и c-Rel, менее выраженным – для p50 (рис. 2А, В, Д). При стимуляции М-триДАП накопление p65, c-Rel и p50 в ядре запаздывало по сравнению с таковым при стимуляции ЛПС (см. рис. 2А, В, Д; табл. 1), что согласуется с запаздыванием синтеза мРНК *TNF* (см. рис. 1А). При одновременном добавлении М-триДАП и ЛПС максимальный уровень p65 в ядре достигался достоверно раньше, чем при стимуляции М-триДАП или ЛПС по отдельности (см. табл. 1). Максимум уровня c-Rel при сочетанной стимуляции достигался в те же сроки, что и при стимуляции М-триДАП,

Рис. 1. Кинетика экспрессии мРНК *TNF* и *IL6* при стимуляции макрофагов М-триДАП, липополисахаридом (ЛПС) и их сочетанием

А, В – $\log$ -трансформированные значения относительной экспрессии (ОЭ) мРНК *TNF* (А) и *IL6* (В); Б и Г – соответствующие значения индексов синергизма; $M \pm \sigma$, $n = 3$; * значения достоверностей: А и В – $p < 0,05$ для сравнения клеток, стимулированных ЛПС и М-триДАП+ЛПС в соответствующих точках; Б и Г – $p < 0,05$ для отличия ИС от 1.

Рис. 2. Кинетика активации NF-κB-сигнального пути в макрофагах при стимуляции М-триДАП, липополисахаридом (ЛПС) и их сочетанием

А, В, Д – уровни p65, c-Rel и p50 в ядре; Б, Г, Е – соответствующие индексы синергизма; Ж, И – уровни IκBa в цитоплазме (Ж) и ядре (И); 3 – уровни мРНК NFKB1A при раздельной и сочетанной стимуляции; К – индексы синергизма для уровней IκBa в ядре; $M \pm \sigma$, $n = 3$; * $p < 0,05$ для отличия ИС от 1.

но раньше, чем при стимуляции ЛПС. Уровни p65, c-Rel и p50 в ядре при сочетанной стимуляции изменялись не-синергическим образом, поскольку ИС ни в одной точке достоверно не превышал 1 (рис. 2Б, Г, Е). В случае c-Rel при сочетанной стимуляции наблюдалась суммация ответов (ИС ≈ 1), а в случае p65 и p50 – инфра-аддитивное взаимодействие (ИС < 1). При этом наиболее низкие ИС, близкие к 0,5, наблюдались для p50. Хотя в данной работе мы не ставили задачу определить ядерную транслокацию конкретных видов гомо- и гетеродимеров NF- κ B, данные по индексам синергизма позволяют предположить, что при сочетанной стимуляции имеет место относительный дефицит p50 в ядре и, следовательно, дефицит ингибиторных гомодимеров p50:p50. В исследованный промежуток времени мы не обнаружили в ядерной фракции макрофагов белка p100/p52 (данные не представлены), что говорит против участия неканонического пути активации NF- κ B в развитии синергического эффекта NOD1-TLR4.

Таким образом, на уровне ядерной транслокации NF- κ B синергический эффект совместной активации NOD1 и TLR4 отсутствует.

Кинетика деградации, ресинтеза и ядерной транслокации IkBa

Условием транслокации NF- κ B в ядро является протеасомная деградация белков семейства IkB, в результате чего демаскируется сигнал ядерной локализации на молекулах NF- κ B. Белки IkB обладают определенной селективностью в отношении конкретных белков NF- κ B: в частности IkBa связывается с наиболее широко представленными в клетке гетеродимерами p65:p50 [16]. При стимуляции ЛПС уже к 15-й минуте происходило почти полное исчезновение IkBa в цитоплазме (рис. 2Ж); минимальные уровни IkBa, составляющие $< 5\%$ от исходных, наблюдались через 25 ± 9 мин после начала стимуляции. При стимуляции М-триДАП деградация IkBa была менее полной, а минимальный уровень IkBa наблюдался позже – через 45 ± 26 мин. При сочетанной стимуляции уровень IkBa достигал минимума в те же сроки, что и при стимуляции ЛПС – через 25 ± 9 мин (см. рис. 2Ж). Период сниженных уровней IkBa в цитозоле соответствовал периоду накопления белков NF- κ B в ядре (см. рис. 2А, В, Д).

После прохождения минимума начиналась фаза ресинтеза IkBa, причем уровни IkBa в цитоплазме, достигнутые к концу эксперимента, были в 1,5–2,5 раза выше

базальных (М-триДАП $<$ ЛПС $\approx$ М-триДАП+ЛПС) (см. рис. 2Ж). Ресинтез был обусловлен возрастанием экспрессии мРНК *NFKB1A* (рис. 23). Интересно, что при сочетанной стимуляции эффекты двух агонистов на экспрессию мРНК *NFKB1A* суммировались, но синергического эффекта не наблюдалось (см. рис. 23).

Вновь синтезируемый белок IkBa транспортируется в ядро, где вновь связывается с белками NF- κ B, способствуя их отделению от промоторов с последующим экспортом из ядра [21]. Уровни IkBa в ядре при различных видах стимуляции нарастали, начиная с 90-й минуты (рис. 2И). ИС при сочетанной стимуляции в этот период колебались около 0,5 (рис. 2К), что говорит о практическом отсутствии суммы ответов на М-триДАП и ЛПС.

Интегральные показатели транслокации NF- κ B и IkBa в ядро

Интегральным показателем, характеризующим накопление NF- κ B и IkBa в ядре за определенный промежуток времени, являются площади под кривыми. Мы рассчитали площади под кривыми в период формирования синергического эффекта (с 60-й по 180-ю минуту эксперимента). Из табл. 2 видно, что при сочетанной стимуляции имеет место более выраженное накопление p65, чем при стимуляции ЛПС, а также большее накопление c-Rel, чем при стимуляции М-триДАП. И наоборот, накопление IkBa в ядре при сочетанной стимуляции было достоверно меньшим, чем при стимуляции ЛПС (см. табл. 2). Накопление c-Rel в ядре при сочетанной стимуляции менялось аддитивно (ИС ≈ 1), накопление p65, p50 и IkBa – инфра-аддитивно (ИС < 1). Обращает внимание ИС $\leq 0,5$ для IkBa, что говорит о взаимно ингибирующем эффекте М-триДАП и ЛПС на ядерную транслокацию IkBa.

Обсуждение

Хотя феномен синергического взаимодействия рецепторов врожденного иммунитета давно известен, его молекулярные механизмы до сих пор остаются неясными [9]. В данной работе установлен этап активации макрофага, на котором происходит формирование синергического эффекта NOD1-TLR4. Если судить по экспрессии мРНК *TNF*, то синергический эффект развивается в интервале 90–150 мин после одновременного добавления к макрофагам агонистов NOD1 и TLR4. В этом интервале времени при стимуляции каждым агонистом по отдельности экспрессия мРНК *TNF* выходит

Таблица 2. Нормализованные значения площадей под кривыми «время–ответ» в интервале 60–180 мин и соответствующие индексы синергизма (ИС)

Показатель	1 М-триДАП	2 ЛПС	3 М-триДАП+ЛПС	P_{1-3}	P_{2-3}	ИС	p (ИС)*
p65 в ядре	$1,16 \pm 0,5$	1	$1,19 \pm 0,11$	0,47	0,046 ↑	$0,57 \pm 0,16$	0,022 ↓
c-Rel в ядре	$0,79 \pm 0,46$	1	$1,8 \pm 0,98$	0,05 ↑	0,15	$0,97 \pm 0,36$	0,45
p50 в ядре	$0,75 \pm 0,43$	1	$0,88 \pm 0,18$	0,28	0,19	$0,51 \pm 0,07$	0,003 ↓
IkBa в ядре	$0,33 \pm 0,25$	1	$0,45 \pm 0,23$	0,35	0,026 ↓	$0,36 \pm 0,22$	0,019 ↓

Примечание. ЛПС – липополисахарид; * – достоверность отличия ИС от 1; $M \pm \sigma$, $n = 3$.

на плато и начинает снижаться, а при сочетанной стимуляции – продолжает нарастать, что говорит о продолжающейся транскрипции. После 150-й минуты экспрессия мРНК *TNF* при сочетанной стимуляции сохраняется на плато, что может быть обусловлено продолжающейся транскрипцией и/или повышением стабильности мРНК.

В работе D.W. Abbott и соавт., выполненной на перевиваемых макрофагальных клеточных линиях, утверждалось, что синергическое взаимодействие NOD-рецепторов и TLR обусловлено синергической активацией киназного комплекса IKK [12]. Наши результаты не подтверждают эту концепцию: хотя активацию IKK мы напрямую не исследовали, результат этой активации – деградация IκBα и транслокация NF-κB в ядро – при сочетанной стимуляции не является синергическим. Для ядерной транслокации c-Rel мы наблюдали суммацию эффектов двух агонистов, для p65 и p50 эффект сочетания агонистов был инфра-аддитивным. Также, по данным нашей и других работ, при сочетанной стимуляции NOD и TLR отсутствует синергическая активация и других сигнальных путей, в частности МАП-киназного [11, 28]. Таким образом, каждый из двух рецепторов, видимо, активирует свою часть общего пула сигнальных белков в клетке. Как следствие, вплоть до поступления активационного сигнала в ядро взаимодействие сигналов от двух рецепторов носит несинергический характер. Не исключено, что некоторые компоненты сигнальных путей максимально активируются уже при стимуляции какого-либо одного рецептора; в таком случае будет отсутствовать даже суммация сигналов (что, возможно, наблюдалось в случае ядерной транслокации p50). Однако на выходе из ядра имеется синергическое усиление экспрессии мРНК *TNF* и *IL6*.

Может ли суммация сигналов от двух рецепторов, наблюдаемая на уровне ядерной транслокации NF-κB, приводить к синергическому эффекту на уровне транскрипции мРНК цитокинов? Как видно из динамики ИС (см. рис. 2Б, Г и табл. 2), при сочетанной стимуляции в ядре все же поддерживаются более высокие концентрации p65 и c-Rel, чем при стимуляции каждым агонистом по отдельности. Теоретически это может приводить к более полному и длительному занятию данными факторами транскрипции сайтов связывания в соответствующих промоторах, что может вести к более высокой экспрессии генов-мишеней NF-κB. Однако неочевидно, что эта экспрессия будет именно синергической. Интересно, что еще один исследованный нами NF-κB-зависимый ген – *NFKB1A* – при сочетанной стимуляции индуцировался несинергическим образом (см. рис. 23). Эти результаты позволяют предположить, что синергической индукции подвержена только часть

NF-κB-индуцибельных генов и что для этого необходимо связывание дополнительных факторов транскрипции с регуляторными сайтами таких генов.

Способствовать развитию синергического ответа может недостаток факторов негативной регуляции NF-κB-зависимого сигналинга. Возможным проявлением этого механизма является относительный дефицит IκBα в ядре при сочетанной стимуляции М-триДАП и ЛПС. В то время как уровни c-Rel и p65 в ядре под действием сочетания агонистов меняются аддитивно или инфра-аддитивно (то есть становятся выше, чем при стимуляции каждым агонистом по отдельности), уровни IκBα при сочетанной стимуляции оказываются ниже, чем при стимуляции ЛПС (ИС ≤ 0,5; см. табл. 2). Следовательно, в период синергического нарастания экспрессии мРНК *TNF* и *IL6* возможен относительный дефицит ингибиторного белка IκBα в ядре, что может способствовать более стойкому взаимодействию белков NF-κB с промоторами генов цитокинов, результатом чего будет увеличение транскрипции соответствующих мРНК. Ответить на этот вопрос могут эксперименты по иммунопреципитации хроматина антителами к белкам NF-κB.

При сочетанной активации NOD1 и TLR4 меняется не только амплитуда, но и временные характеристики активации NF-κB. Так, мы наблюдали укорочение времени достижения пиковых концентраций p65 в ядре при сочетанной стимуляции по сравнению со стимуляцией ЛПС или М-триДАП по отдельности (см. рис. 2А и табл. 1). В этой связи интересна работа А.В. Багаева и соавт. [32], где показано, что скорость ядерной транслокации p65 при стимуляции макрофагов мыши ЛПС положительно коррелирует с преактивационным уровнем p65 в ядре. Поскольку NOD1 и TLR4 находятся в различных компартментах клетки, при одновременном добавлении агонистов активация NOD1 отстает от активации TLR4 (см. рис. 2А, В). Поэтому сигнал от NOD1 приходит в ядро в тот момент, когда там уже имеются повышенные уровни p65 вследствие активации TLR4, что может вести к ускорению NOD1-зависимой транслокации p65 и к более раннему достижению пиковой концентрации p65 в ядре. Однако вклад этого механизма в развитие синергического эффекта требует дальнейшего изучения.

Заключение

Таким образом, хотя NF-κB играет важнейшую роль в активации макрофагов под действием агонистов NOD1 и TLR4, синергическое усиление экспрессии цитокинов при одновременной активации этих рецепторов не объясняется синергической активацией NF-κB-зависимого сигнального пути.

■ Литература

1. Kim Y.G., Park J.H., Shaw M.H., Franchi L., Inohara N., Nunez G. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. *Immunity*. 2008; 28 (2): 246–57.
2. Chamaillard M., Hashimoto M., Horie Y., Masumoto J., Qiu S., Saab L. et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bac-

terial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* 2003; 4 (7): 702–7.

3. Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*. 1998; 282 (5396): 2085–8.

4. Fritz J.H., Girardin S.E., Fitting C., Werts C., Mengin-Lecreulx D., Caroff M. et al. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35 (8): 2459–70.
5. Пичугин А.В., Багаев А.В., Лебедева Е.С., Чулкина М., Атауллаханов Р.И. Синергическая продукция цитокинов дендритными клетками в ответ на одновременную активацию парами агонистов различных рецепторов врожденного иммунитета. *Иммунология* 2017; 38 (1): 118–23.
6. Wolfert M.A., Murray T.F., Boons G.J., Moore J.N. The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (42): 39 179–86.
7. van Heel D.A., Ghosh S., Butler M., Hunt K., Foxwell B.M., Mengin-Lecreulx D. et al. Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35 (8): 2471–6.
8. Murch O., Abdelrahman M., Kapoor A., Thiemermann C. Muramyl dipeptide enhances the response to endotoxin to cause multiple organ injury in the anesthetized rat. *Shock.* 2008; 29 (3): 388–94.
9. Pashenkov M.V., Murugina N.E., Budikhina A.S., Pinegin B.V. Synergistic interactions between NOD receptors and TLRs: Mechanisms and clinical implications. *J. Leukoc. Biol.* 2019; 105 (4): 669–80.
10. Tikhvatulin A.I., Gitlin I.I., Shcheblyakov D.V., Artemicheva N.M., Burdelya L.G., Shmarov M.M. et al. Combined stimulation of Toll-like receptor 5 and NOD1 strongly potentiates activity of NF-kappaB, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* 2013; 81 (10): 3855–64.
11. Tikhvatulin A.I., Dzharullaeva A.S., Tikhvatulina N.M., Shcheblyakov D.V., Shmarov M.M., Dolzhikova I.V. et al. Powerful complex immunoadjuvant based on synergistic effect of combined TLR4 and NOD2 activation significantly enhances magnitude of humoral and cellular adaptive immune responses. *PLoS One.* 2016; 11 (5): e0155650.
12. Abbott D.W., Yang Y., Hutti J.E., Madhavarapu S., Kelliher M.A., Cantley L.C. Coordinated regulation of Toll-like receptor and NOD2 signaling by K63-linked polyubiquitin chains. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27 (17): 6012–25.
13. Tsai W.H., Huang D.Y., Yu Y.H., Chen C.Y., Lin W.W. Dual roles of NOD2 in TLR4-mediated signal transduction and -induced inflammatory gene expression in macrophages. *Cell. Microbiol.* 2011; 13 (5): 717–30.
14. Лебедева Е.С., Багаев А.В., Чулкина М.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И. NF-кВ-, но не MAPK-сигнальный путь определяет синергический ответ макрофагов на одновременную активацию двух типов рецепторов TLR4+NOD2 или TLR9+NOD2. *Иммунология* 2017; 38 (2): 76–82.
15. Пичугин А.В., Багаев А.В., Лебедева Е.С., Чулкина М.М., Атауллаханов Р.И. Синергическая продукция цитокинов дендритными клетками в ответ на одновременную активацию парами агонистов различных рецепторов врожденного иммунитета. *Иммунология* 2017; 38 (2): 118–23.
16. Vallabhapurapu S., Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27: 693–733.
17. Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro L.A., Antignac A., Jehanno M., Viala J. et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science.* 2003; 300 (5625): 1584–7.
18. Wang C., Deng L., Hong M., Akkaraju G.R., Inoue J., Chen Z.J. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature.* 2001; 412 (6844): 346–51.
19. Kim J.Y., Omori E., Matsumoto K., Nunez G., Ninomiya-Tsuji J. TAK1 is a central mediator of NOD2 signaling in epidermal cells. *J. Biol. Chem.* 2008; 283 (1): 137–44.
20. Hasegawa M., Fujimoto Y., Lucas P.C., Nakano H., Fukase K., Nunez G. et al. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *Embo J.* 2008; 27 (2): 373–83.
21. Mulero M.C., Wang V.Y., Huxford T., Ghosh G. Genome reading by the NF-kappaB transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47 (19): 9967–89.
22. Pan Q., Kravchenko V., Katz A., Huang S., Li M., Mathison J.C. et al. NF-kappa B-inducing kinase regulates selected gene expression in the Nod2 signaling pathway. *Infect. Immun.* 2006; 74 (4): 2121–7.
23. Coldewey S.M., Rogazzo M., Collino M., Patel N.S., Thiemermann C. Inhibition of IkappaB kinase reduces the multiple organ dysfunction caused by sepsis in the mouse. *Dis. Model. Mech.* 2013; 6 (4): 1031–42.
24. Covert M.W., Leung T.H., Gaston J.E., Baltimore D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science.* 2005; 309 (5742): 1854–7.
25. Tay S., Hughey J.J., Lee T.K., Lipniacki T., Quake S.R., Covert M.W. Single-cell NF-kappaB dynamics reveal digital activation and analogue information processing. *Nature.* 2010; 466 (7303): 267–71.
26. Purvis J.E., Lahav G. Encoding and decoding cellular information through signaling dynamics. *Cell.* 2013; 152 (5): 945–56.
27. Kellogg R.A., Tian C., Etzrodt M., Tay S. Cellular decision making by non-integrative processing of TLR inputs. *Cell Rep.* 2017; 19 (1): 125–35.
28. Муругина Н.Е., Будихина А.С., Максимчик П.В., Дагиль Ю.А., Баясова Л.С., Муругин В.В., Чкадуа Г.З., Пинегин Б.В., Пашенков М.В. Синергическое взаимодействие рецепторов NOD1 и TLR4 врожденного иммунитета: транскрипционные и метаболические аспекты. *Иммунология.* 2019; 40 (2): 9–16.
29. Pashenkov M.V., Balyasova L.S., Dagil Y.A., Pinegin B.V. The role of the p38-MNK-eIF4E signaling axis in TNF production downstream of the NOD1 receptor. *J. Immunol.* 2017; 198 (4): 1638–48.
30. Shebzukhov Iu.V., Kuprash D.V. [Transcriptional regulation of TNF/LT locus in immune cells]. *Mol. Biol. (Mosk).* 2011; 45 (1): 56–67.
31. Luo Y., Zheng S.G. Hall of Fame among pro-inflammatory cytokines: interleukin-6 gene and its transcriptional regulation mechanisms. *Front. Immunol.* 2016; 7: 604.
32. Bagaev A.V., Garaeva A.Y., Lebedeva E.S., Pichugin A.V., Ataullakhanov R.I., Ataullakhanov F.I. Elevated pre-activation basal level of nuclear NF-kappaB in native macrophages accelerates LPS-induced translocation of cytosolic NF-kappaB into the cell nucleus. *Sci. Rep.* 2019; 9 (1): 4563.

■ References

1. Kim Y.G., Park J.H., Shaw M.H., Franchi L., Inohara N., Nunez G. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. *Immunity.* 2008; 28 (2): 246–57.
2. Chamailard M., Hashimoto M., Horie Y., Masumoto J., Qiu S., Saab L., et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* 2003; 4 (7): 702–7.
3. Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998; 282 (5396): 2085–8.
4. Fritz J.H., Girardin S.E., Fitting C., Werts C., Mengin-Lecreulx D., Caroff M., et al. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35 (8): 2459–70.
5. Pichugin A.V., Bagaev A.V., Lebedeva E.S., Chulкина M., Ataullakhanov R.I. Synergistic cytokine production by murine dendritic cells in response to their simultaneous activation with pairs of agonists of different innate immune receptors. *Immunologia.* 2017; 38 (1): 118–23. (in Russian)
6. Wolfert M.A., Murray T.F., Boons G.J., Moore J.N. The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (42): 39 179–86.
7. van Heel D.A., Ghosh S., Butler M., Hunt K., Foxwell B.M., Mengin-Lecreulx D., et al. Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35 (8): 2471–6.
8. Murch O., Abdelrahman M., Kapoor A., Thiemermann C. Muramyl dipeptide enhances the response to endotoxin to cause multiple organ injury in the anesthetized rat. *Shock.* 2008; 29 (3): 388–94.
9. Pashenkov M.V., Murugina N.E., Budikhina A.S., Pinegin B.V. Synergistic interactions between NOD receptors and TLRs: Mechanisms and clinical implications. *J. Leukoc. Biol.* 2019; 105 (4): 669–80.

10. Tikhvatulin A.I., Gitlin I.I., Shcheblyakov D.V., Artemicheva N.M., Burdelya L.G., Shmarov M.M., et al. Combined stimulation of Toll-like receptor 5 and NOD1 strongly potentiates activity of NF- κ B, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun.* 2013; 81 (10): 3855–64.
11. Tikhvatulin A.I., Dzharullaeva A.S., Tikhvatulina N.M., Shcheblyakov D.V., Shmarov M.M., Dolzhikova I.V., et al. Powerful complex immunoadjuvant based on synergistic effect of combined TLR4 and NOD2 activation significantly enhances magnitude of humoral and cellular adaptive immune responses. *PLoS One.* 2016; 11 (5): e0155650.
12. Abbott D.W., Yang Y., Hutt J.E., Madhavarapu S., Kelliher M.A., Cantley L.C. Coordinated regulation of Toll-like receptor and NOD2 signaling by K63-linked polyubiquitin chains. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27 (17): 6012–25.
13. Tsai W.H., Huang D.Y., Yu Y.H., Chen C.Y., Lin W.W. Dual roles of NOD2 in TLR4-mediated signal transduction and -induced inflammatory gene expression in macrophages. *Cell. Microbiol.* 2011; 13 (5): 717–30.
14. Lebedeva E.S., Bagaev A.V., Chulkina M.M., Pichugin A.V., Ataullakhanov R.I. NF- κ B, but not MAPK-signaling pathway determines synergistic response of macrophages to the simultaneous activation of two types receptors TLR4+NOD2 or TLR9+NOD2. *Immunologia* 2017; 38 (2): 76–82. (in Russian)
15. Pichugin A.V., Bagaev A.V., Lebedeva E.S., Chulkina M.M., Ataullakhanov R.I. Synergistic cytokine production by murine dendritic cells in response to their simultaneous activation with pairs of agonists of different innate immune receptors. *Immunologia* 2017; 38 (2): 118–23. (in Russian)
16. Vallabhapurapu S., Karin M. Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27: 693–733.
17. Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro L.A., Antignac A., Jehanno M., Viala J., et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science.* 2003; 300 (5625): 1584–7.
18. Wang C., Deng L., Hong M., Akkaraju G.R., Inoue J., Chen Z.J. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature.* 2001; 412 (6844): 346–51.
19. Kim J.Y., Omori E., Matsumoto K., Nunez G., Ninomiya-Tsuji J. TAK1 is a central mediator of NOD2 signaling in epidermal cells. *J. Biol. Chem.* 2008; 283 (1): 137–44.
20. Hasegawa M., Fujimoto Y., Lucas P.C., Nakano H., Fukase K., Nunez G., et al. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF- κ B activation. *Embo J.* 2008; 27 (2): 373–83.
21. Mulero M.C., Wang V.Y., Huxford T., Ghosh G. Genome reading by the NF- κ B transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47 (19): 9967–89.
22. Pan Q., Kravchenko V., Katz A., Huang S., Li M., Mathison J.C., et al. NF- κ B-inducing kinase regulates selected gene expression in the Nod2 signaling pathway. *Infect. Immun.* 2006; 74 (4): 2121–7.
23. Coldewey S.M., Rogazzo M., Collino M., Patel N.S., Thiemermann C. Inhibition of IkappaB kinase reduces the multiple organ dysfunction caused by sepsis in the mouse. *Dis. Model. Mech.* 2013; 6 (4): 1031–42.
24. Covert M.W., Leung T.H., Gaston J.E., Baltimore D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation. *Science.* 2005; 309 (5742): 1854–7.
25. Tay S., Hughey J.J., Lee T.K., Lipniacki T., Quake S.R., Covert M.W. Single-cell NF- κ B dynamics reveal digital activation and analogue information processing. *Nature.* 2010; 466 (7303): 267–71.
26. Purvis J.E., Lahav G. Encoding and decoding cellular information through signaling dynamics. *Cell.* 2013; 152 (5): 945–56.
27. Kellogg R.A., Tian C., Etzrodt M., Tay S. Cellular decision making by non-integrative processing of TLR inputs. *Cell Rep.* 2017; 19 (1): 125–35.
28. Murugina N.E., Budikhina A.S., Maximchik P.V., Dagil Y.A., Balyasova L.S., Murugin V.V., Chkadua G.Z., Pinegin B.V., Pashenkov M.V. Synergistic interactions of NOD1 and TLR4 receptors of innate immunity: transcriptional and metabolic aspects. *Immunologia* 2019; 40 (2): 9–16. (in Russian)
29. Pashenkov M.V., Balyasova L.S., Dagil Y.A., Pinegin B.V. The role of the p38-MNK-eIF4E signaling axis in TNF production downstream of the NOD1 receptor. *J. Immunol.* 2017; 198 (4): 1638–48.
30. Shebzukhov Iu.V., Kuprash D.V. [Transcriptional regulation of TNF/LT locus in immune cells]. *Mol. Biol. (Mosk).* 2011; 45 (1): 56–67.
31. Luo Y., Zheng S.G. Hall of fame among pro-inflammatory cytokines: interleukin-6 gene and its transcriptional regulation mechanisms. *Front. Immunol.* 2016; 7: 604.
32. Bagaev A.V., Garaeva A.Y., Lebedeva E.S., Pichugin A.V., Ataullakhanov R.I., Ataullakhanov F.I. Elevated pre-activation basal level of nuclear NF- κ B in native macrophages accelerates LPS-induced translocation of cytosolic NF- κ B into the cell nucleus. *Sci. Rep.* 2019; 9 (1): 4563.