

# ПРИМЕНЕНИЕ ИНГИБИТОРНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ МУРАМИЛПЕПТИДНОГО ИММУНОМОДУЛЯТОРА «ПОЛИМУРАМИЛ»

Пащенко М.В., Алхазова Б.И., Львов В.Л., Пинегин Б.В.

ГНЦ «Институт иммунологии ФМБА России», Москва

**Резюме.** С помощью ингибиторного анализа исследованы механизмы действия двух мурамилпептидов, входящих в состав препарата «Полимурамил»: 1) N-ацетил-D-глюкозаминил-( $\beta 1 \rightarrow 4$ )-N-ацетил-D-мурамоил-L-аланил-D-изоглютаминил-мезо-диаминопимелиновой кислоты (ГМтри); 2) димерного мурамилпептида (диГМтетра), в котором два мономера [N-ацетил-D-глюкозаминил-( $\beta 1 \rightarrow 4$ )-N-ацетил-D-мурамоил-L-аланил-D-изоглютаминил-мезо-диаминопимелоил-D-аланин] соединены путем амидной связи между карбоксильной группой терминального D-аланина одного мономера и  $\omega$ -аминогруппой мезо-диаминопимелиновой кислоты другого мономера. Продукция фактора некроза опухолей макрофагами (МФ) человека, стимулированными *in vitro* ГМтри и диГМтетра, подавлялась веществами SB203580 (ингибитор киназы RIP2), генистеином (ингибитор протеинтирозинкиназ) и BAY 11-7082 (ингибитор IкВ-киназы). Ответ на диГМтетра, кроме того, подавлялся дайнасором (ингибитор клатрин-зависимого эндоцитоза) и коктейлем ингибиторов протеаз широкого спектра действия. Таким образом, активирующее влияние компонентов «Полимурамила» на МФ обеспечиваются минимум тремя биологическими процессами: 1) клатрин-зависимым эндоцитозом; 2) пептидазным процессингом диГМтетра; 3) активацией сигнальной цепочки «RIP2 – IкВ-киназа – фактор транскрипции NF- $\kappa$ B».

*Ключевые слова:* мурамилпептиды, макрофаги, SB203580, генистеин, фактор некроза опухолей.

*Pashenkov M.V., Alkhasova B.I., L'vov V.L., Pinegin B.V.*

## APPLICATION OF INHIBITOR ANALYSIS FOR STUDYING MECHANISMS AND ACTIONS OF POLYMURAMYL, A MURAMYL PEPTIDE-BASED IMMUNE MODULATOR

**Abstract.** In present study, the following low-MW inhibitors were used to dissect mechanisms of action for two muramyl peptide components of Polymuramyl, an immunomodulatory drug: (1) N-acetyl-D-glucosaminyl-( $\beta 1 \rightarrow 4$ )-N-acetyl-D-muramoyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-meso-diaminopimelic acid (GMtri); (2) a dimeric muramyl peptide (diGMtetra), wherein two monomers [N-acetyl-D-glucosaminyl-( $\beta 1 \rightarrow 4$ )-N-acetyl-D-muramoyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-meso-diaminopimeloyl-D-alanin] are linked via an amide bond

### **Адрес для переписки:**

Пащенко Михаил Владимирович, к.м.н.,  
ведущий научный сотрудник,  
Институт иммунологии, лаборатория  
клинической иммунологии  
115478, Москва, Каширское шоссе, 24, корп. 2.  
Тел.: (499) 617-76-49.  
Факс: (499) 617-10-27.  
E-mail: mvpashenkov@yandex.ru

between the carboxyl group of terminal D-alanin at one monomer and the  $\omega$ -amino group of meso-diaminopimelic acid at another monomer. *In vitro* production of tumor necrosis factor (TNF) by human macrophages stimulated with GMtri or diGMtetra was shown to be inhibited by SB203580 (a RIP2 kinase inhibitor), genistein (a protein tyrosine kinase inhibitor) and BAY 11-7082 (an IкВ-kinase inhibitor). Moreover, response to diGMtetra was inhibited by dynasore (an

inhibitor of clathrin-dependent endocytosis), as well as by a broad-range protease-inhibiting cocktail. Thus, activating effects upon macrophages induced by the Polymuramyl components is provided by, at least, three biological processes: (1) clathrin-dependent endocytosis; (2) peptidase-mediated processing of diGMtetra; 3) activation of a signal chain RIP2 – I $\kappa$ B-kinase – NF- $\kappa$ B transcription factor. (*Med. Immunol.*, 2013, vol. 15, N 1, pp 21-28)

*Keywords: muramyl peptides, macrophages, SB203580, genistein, tumor necrosis factor.*

## Введение

Мурамилпептиды – короткие гликопептидные фрагменты пептидогликана (ПГ), которые образуются при обработке ПГ лизоцимом. Мурамилпептиды и их синтетические аналоги широко применяются в качестве иммуностимуляторов [20, 28]. Мурамилпептиды распознаются рецепторами NOD1 и NOD2, которые находятся в цитозоле клеток иммунной системы, эпителиальных клеток и ряда других [5, 6]. NOD1 распознает мурамилпептиды грамотрицательных бактерий, содержащие остаток мезо-диаминопимелиновой кислоты (мезо-ДАП) [5, 7]. NOD2 распознает мурамилдипептид (МДП) и глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП) – фрагменты ПГ практически всех бактерий, а также мурамилтрипептид с концевым L-лизином, характерный для грамположительных бактерий [6, 7, 19]. Активация NOD1 и NOD2 ведет к индукции экспрессии медиаторов воспаления, антимикробных пептидов и других защитных факторов [4, 13, 18, 22, 29].

Молекулярные механизмы действия мурамилпептидов на клетки интенсивно изучаются. Поскольку рецепторы NOD1 и NOD2 находятся в цитозоле, то мурамилпептиды вначале поступают в эндосомальный компартмент клеток (вероятнее всего, путем клатрин-зависимого эндоцитоза [14, 16]), откуда доставляются в цитозоль, причем описано несколько путей их трансмембранного транспорта: 1) с участием олигопептидных транспортеров SLC15A4 [14] и PerT1 [27]; 2) с участием канала, образованного белком паннексин-1 [11, 17]. Вклад каждого из этих путей, вероятно, зависит от типа мурамилпептидов, типа клеток и других факторов.

Проникшие в цитозоль мурамилпептиды вызывают активацию NOD-рецепторов, хотя сам факт взаимодействия мурамилпептидов с NOD1/NOD2 пока не установлен [24]. Активированные NOD-рецепторы олигомеризуются и привлекают киназу RIP2 [12]. RIP2 служит адаптором, с которым взаимодействует киназа TAK-1 и  $\gamma$ -субъединица I $\kappa$ B-киназы (IKK $\gamma$  или NEMO). Далее, по-видимому, TAK-1 фосфорилирует субъединицу IKK $\beta$ , что приводит к активации

комплекса IKK [23, 31]. Последний фосфорилирует ингибиторный белок I $\kappa$ B и инициирует его деградацию. Фактор транскрипции NF- $\kappa$ B, освобожденный от ингибирующего влияния I $\kappa$ B, поступает в ядро и инициирует экспрессию генов.

Несмотря на интенсивную работу, некоторые аспекты механизмов действия мурамилпептидов остаются неизученными. Так, в большинстве работ исследуются мономерные мурамилпептиды, углеводная часть которых состоит либо из одного остатка N-ацетилмурамовой кислоты, либо из дисахарида N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил, а пептидная часть представлена 2–4 аминокислотными остатками. Однако в нативном ПГ пептидные цепи, отходящие от соседних гликановых цепей, образуют друг с другом ковалентные сшивки. Поэтому при расщеплении ПГ, катализируемом лизоцимом, образуются димерные мурамилпептиды, в которых имеется два дисахаридных остатка, соединенных мостиком из 8 и более аминокислот. Димерные мурамилпептиды в низких концентрациях не активируют NOD-рецепторы в модельных клетках – клетках HEK293T, трансгенно экспрессирующих NOD1 или NOD2 [9, 11], но активируют макрофаги МФ человека [22]. Информация о механизмах действия димерных мурамилпептидов практически отсутствует.

Недавно мы сообщили об иммуностимулирующих свойствах комплекса мурамилпептидов (КМП), полученного из ПГ грамотрицательной бактерии – *S. typhi* [1]. КМП состоит из трех мурамилпептидов: 1) N-ацетил-D-глюкозаминил-( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)-N-ацетил-D-мурамоил-L-аланил-D-изоглютаминил-мезо-диаминопимелиновой кислоты (ГМтри); 2) N-ацетил-D-глюкозаминил-( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)-N-ацетил-D-мурамоил-L-аланил-D-изоглютаминил-мезо-диаминопимелоил-D-аланина (ГМтетра) и 3) димера ГМтетра (диГМтетра), в котором мономерные остатки ГМтетра соединены путем амидной связи между карбоксильной группой терминального D-аланина одного остатка ГМтетра и  $\omega$ -аминогруппой мезо-диаминопимелиновой кислоты другого остатка ГМтетра. КМП под коммерческим названием «Полимурамил» успешно прошел доклиниче-

ские и клинические испытания [2, 3]. **Целью настоящей работы** было уточнение молекулярных механизмов действия КМП, в частности двух его компонентов – ГМтри и диГМтетра, являющихся, соответственно, мономерным и димерным мурамилпептидами. В качестве клеточной модели использовали макрофаги (МФ) человека, которые представляют собой одну из основных мишеней иммуностимуляторов. МФ стимулировали *in vitro* мурамилпептидами или контрольным препаратом – липополисахаридом (ЛПС) – в присутствии различных низкомолекулярных ингибиторов. В качестве выходного параметра использовали продукцию фактора некроза опухоли (ФНО) как одного из индикаторных цитокинов, характеризующих активацию клеток врожденной иммунной системы.

## Материалы и методы

### Мурамилпептиды и ЛПС

ГМтри и диГМтетра получали из ПГ *S. typhi*, как описано ранее [1, 22]. По данным LAL-теста (EndoSafe КТА; Charles River Laboratories, США), уровни эндотоксина во всех препаратах были ниже 0,01 эндотоксиновой единицы (ЭЕ) на 1 мкг. ЛПС *E. coli* штамм O111:B4 был куплен у Sigma (США).

### Ингибиторы

Коктейль ингибиторов протеаз (КИП) широкого спектра действия с активностью против сериновых, цистеиновых, аспартат- и аминокептидаз, был куплен у Sigma (каталожный № P8340). Генистеин, дайнасор и ВАУ 11-7082 были закуплены у Merck (Германия), SB203580 – у Sigma. Антагонист паннексина-1  $^{10}$ panx1, представляющий собой пептид с последовательностью WRQAAFVDSY [17], был синтезирован в Институте биоорганической химии им. Овчинникова и Шемякина (Москва).

### Культивирование и стимуляция МФ

Эффект каждого ингибитора оценивали на МФ, полученных от минимум 6 различных здоровых доноров. МФ получали из моноцитов крови путем 6-суточного культивирования с гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (Invitrogen, Великобритания), как описано ранее [22]. МФ отделяли от пластика путем трипсинизации, отмывали, подсчитывали и приводили к концентрации  $4 \times 10^5$  клеток/мл в полной культуральной среде (RPMI-1640 с добавлением 2 мМ L-глутамин и 10% фетальной телячьей сыворотке [все РАА, Австрия]). По 100 мкл этой суспензии ( $4 \times 10^4$  клеток) вносили в лунки 96-луночных плоскодонных план-

шетов. Давали клеткам прикрепиться к пластику (4–6 ч при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>), после чего среду полностью удаляли и вносили 200 мкл свежей среды, содержащей ингибиторы в требуемых концентрациях. Планшеты инкубировали 15 мин при 37 °С, после чего добавляли ГМтри или ГМтетра до конечной концентрации 10 мкг/мл, либо ЛПС до конечной концентрации 0,1 мкг/мл, либо ПКС (отрицательный контроль). Клетки культивировали 24 ч, после чего собирали супернатанты. Токсичность ингибиторов оценивали путем осмотра культур в инвертированном микроскопе перед сбором супернатантов. Данную концентрацию ингибитора считали токсичной при видимых изменениях адгезивности, формы, гранулярности или численности клеток.

### Иммуноферментный анализ (ИФА)

Уровни ФНО в супернатантах МФ исследовали методом сэндвич-ИФА с использованием набора реактивов фирмы «Цитокин» (Санкт-Петербург) согласно инструкции производителя. Эффект ингибиторов оценивали как остаточную продукцию (ОП) ФНО, которую рассчитывали по формуле:

$$ОП\ ФНО = \frac{C_{стим. + ингиб.} - C_{спонт.}}{C_{стим.} - C_{спонт.}} \times 100\%,$$

где  $C_{стим.}$  – концентрация ФНО в присутствии данного стимулятора,  $C_{стим.+ингиб.}$  – концентрация в присутствии данного стимулятора и ингибитора,  $C_{спонт.}$  – концентрация в отсутствие стимуляторов и ингибиторов.

### Статистическая обработка данных

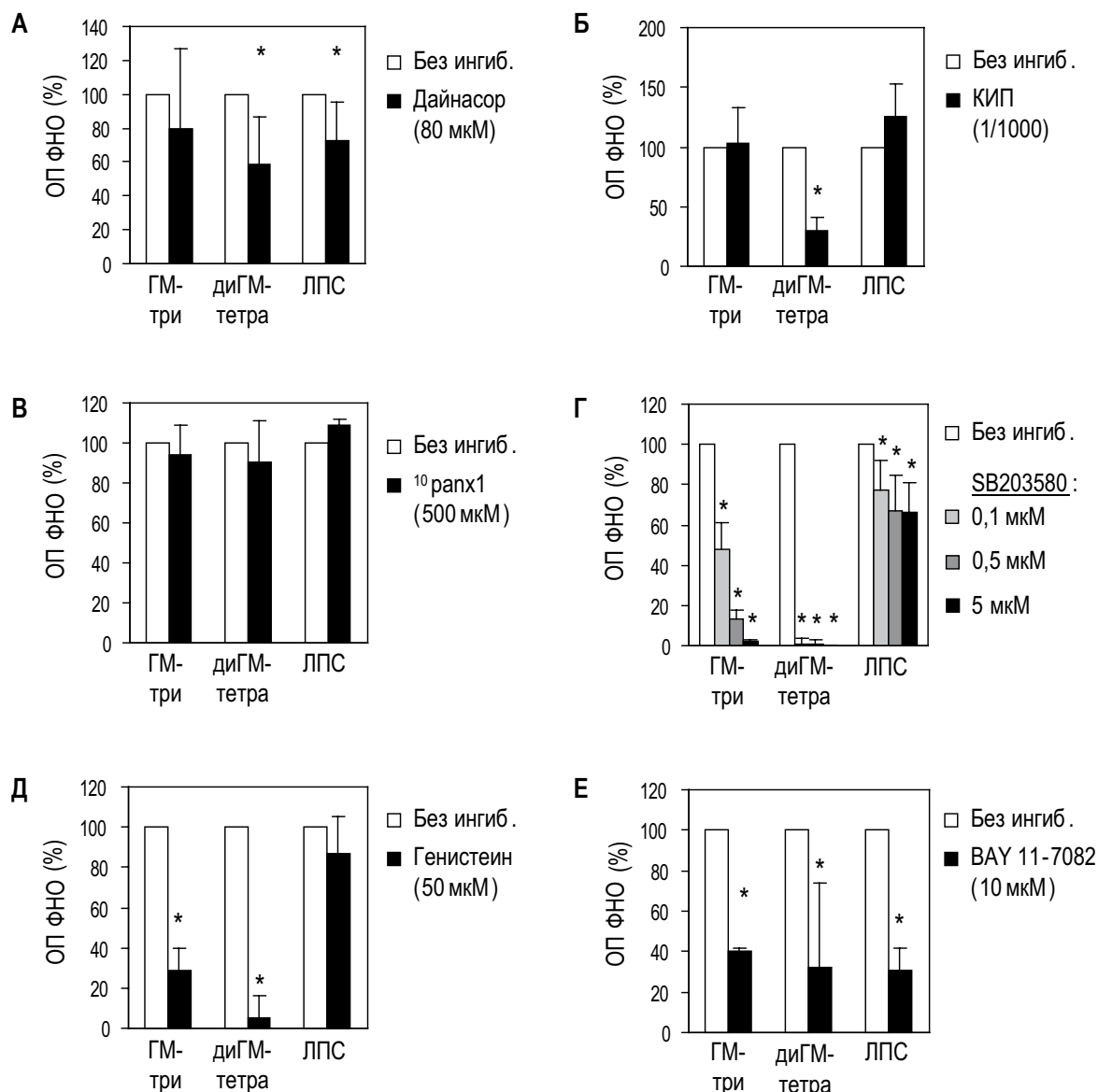
Для сравнения парных измерений использовали тест Вилкоксона. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты

### Роль клатрин-зависимого эндоцитоза в механизмах действия ГМтри и диГМтетра

ГМтри и ЛПС являются мощными индукторами синтеза ФНО макрофагами, тогда как диГМтетра несколько менее активен [22]. В настоящей работе уровни ФНО в супернатантах нестимулированных МФ составили  $71 \pm 39$  пг/мл, при стимуляции ЛПС –  $6084 \pm 3987$  пг/мл, при стимуляции ГМтри –  $3424 \pm 2486$  пг/мл, при стимуляции диГМтетра –  $956 \pm 109$  пг/мл ( $M \pm \sigma$ ).

Lee et al. показали, что клетки НЕК293Т поглощают мурамилпептиды, содержащие остаток мезо-ДАП, путем клатрин-зависимого эндоцитоза [14]. Мы стимулировали МФ ГМтри, диГМтетра и ЛПС в присутствии дайнасора – специфического ингибитора клатрин-зависимого эндоцитоза



**Рисунок 1. Остаточная продукция ФНО (ОП ФНО) в присутствии указанных стимуляторов и ингибиторов (формула расчета – см. Материалы и методы)**

**Примечание.** ОП ФНО в присутствии данного стимулятора без ингибиторов принята за 100%. Показаны  $M \pm \sigma$ ,  $n \geq 6$ . \* –  $p < 0,05$  для сравнения ОП ФНО в присутствии и в отсутствии ингибитора (тест Вилкоксона).

[15]. В концентрации 80 мкМ дайнасор умеренно ингибировал ЛПС-индуцированную продукцию ФНО (ОП ФНО =  $27 \pm 22\%$ ; рис. 1А), что согласуется с данными Kagan et al. [10]. Влияние дайнасора на ГМтри-индуцированную продукцию ФНО варьировало от донора к донору и было статистически недостоверным. Однако дайнасор значительно подавлял выработку ФНО, индуцированную диГМтетра (ОП ФНО =  $41 \pm 28\%$ ; рис. 1А). Таким образом, клатрин-зависимый эндоцитоз вносит больший вклад в поглощение димерного мурамилпептида диГМтетра, чем в поглощение мономерного ГМтри.

### Роль пептидаз и паннексина-1 в механизмах действия ГМтри и диГМтетра

Мурамилпептиды, поступившие в эндосомы, могут подвергаться действию пептидаз. Чтобы установить роль пептидазного процессинга в механизмах действия ГМтри и диГМтетра, МФ стимулировали этими агонистами или ЛПС в присутствии КИП широкого спектра действия. В разведении 1/1000 КИП не влиял на ГМтри- и ЛПС-индуцированную продукцию ФНО, однако существенно ингибировал ответ МФ на диГМтетра (ОП ФНО =  $70 \pm 11\%$ ; рис. 1Б). В более низких разведениях (1/250 и менее)

КИП был токсичен. Таким образом, эндоцитированный диГМтетра, вероятно, расщепляется на фрагменты, которые и оказывают активирующее действие на МФ.

Антагонист паннексина-1  $^{10}\mu\text{panx1}$  в концентрации 500 мкМ [17] не оказывал ингибирующего влияния на продукцию ФНО, индуцированную любым из трех агонистов (рис. 1В). Более вероятно, что транспорт мурамилпептидов из эндосом в цитозоль в МФ происходит с участием олигопептидных транспортеров семейства SLC15 [14].

#### **Ингибитор SB203580 полностью подавляет ответ МФ на ГМтри и диГМтетра**

Соединение SB203580 обычно рассматривается как ингибитор митоген-активируемой протеинкиназы р38, однако ингибирует также киназу RIP2 [8]. SB203580 в концентрациях 0,1–5 мкМ [8] дозозависимо подавлял ГМтри-индуцированную продукцию ФНО, причем при концентрации 5 мкМ подавление было полным (рис. 1Г). Ответ МФ на диГМтетра был полностью подавлен даже при минимальной концентрации SB203580, равной 0,1 мкМ (рис. 1Г). Ответ МФ на ЛПС при максимальной концентрации SB203580 был подавлен лишь на треть (ОП ФНО =  $66\pm 15\%$ ; рис. 1Г). Киназа RIP2 не участвует в передаче сигнала от рецептора ЛПС, но является ключевым компонентом сигнального пути от NOD1 и NOD2 [21]. Поэтому ингибирующий эффект SB203580 на выработку ФНО, индуцированную ГМтри и диГМтетра, наиболее вероятно, обусловлен именно ингибированием RIP2. Умеренное снижение ЛПС-индуцированной продукции ФНО в присутствии SB203580, вероятно, обусловлено ингибированием р38.

#### **Генистеин ингибирует ответ МФ на ГМтри и диГМтетра**

Хотя RIP2 относят к серин-треониновым киназам [24], описана также ее протеинтирозинкиназная активность [23]. Кроме того, генистеин —

ингибитор протеинтирозинкиназ — отменяет потенцирующее действие МДП на продукцию ФНО культурами крысиных астроцитов, индуцированную интерфероном-гамма [25]. В наших опытах генистеин в концентрации 50 мкМ [25, 30] существенно подавлял продукцию ФНО, вызванную ГМтри и диГМтетра (ОП ФНО =  $71\pm 11\%$  и  $95\pm 11\%$  соответственно; рис. 1Д). Генистеин не влиял на ЛПС-индуцированную выработку ФНО.

#### **Ингибитор IκB-киназы подавляет ответ МФ на ГМтри, диГМтетра и ЛПС**

Мурамилпептиды и ЛПС реализуют большую часть своих эффектов, к числу которых относятся и индукция гена ФНО, через фактор транскрипции NF-κB. Для активации NF-κB необходимо отделение от него ингибирующей субъединицы IκB. Последнее происходит вследствие фосфорилирования IκB, которое катализируется IκB-киназой (IKK), и последующего убиквитилирования [26].

Специфический ингибитор IKK — BAY 11-7082 — в концентрации 10 мкМ [9] ингибировал продукцию ФНО, индуцированную ГМтри, диГМтетра и ЛПС, примерно на две трети (рис. 1Е). Более полного эффекта достичь не удалось, так как в более высоких концентрациях (> 25 мкМ) BAY 11-7082 был токсичен по отношению к МФ.

## Обсуждение

В таблице 1 приведены сводные данные всех экспериментов. Результаты, полученные для ГМтри, в целом сопоставимы с ранее опубликованными данными по другим мономерным мурамилпептидам [14, 23, 25, 31]. На основании данных ингибиторного анализа (рис. 1, табл. 1) можно предположить, что ГМтри индуцирует экспрессию ФНО в МФ путем активации сиг-

**ТАБЛИЦА 1. ОСТАТОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ ФНО\* МАКРОФАГАМИ, АКТИВИРОВАННЫМИ ГМтри, диГМтетра И ЛПС В ПРИСУТСТВИИ УКАЗАННЫХ ИНГИБИТОРОВ**

Ингибитор \ Активатор	ГМтри	диГМтетра	ЛПС
Дайнасор	–	++	+
КИП	–	+++	–
$^{10}\mu\text{panx1}$	–	–	–
SB203580 (0,1 мкМ / 5 мкМ)	++/++++	++++/++++	+/+
Генистеин	+++	++++	–
BAY 11-7082	++	+++	+++

**Примечание.** \*Градации остаточной продукции ФНО: «–» – > 80%, «+» – 60–80%; «+++» – 40–60%; «++++» – 20–40%; «+++++» – 0–20%.

нальной цепочки «RIP2 – IKK – NF-κB». Подтверждена описанная ранее роль протеинтирозинкиназной активности в механизмах действия мурамилпептидов [23]. Учитывая наши и литературные данные [8, 23, 31], можно предположить, что SB203580 и генистеин в условиях стимуляции мурамилпептидами реализуют свое действие путем ингибирования одной и той же мишени – RIP2.

Ответ МФ на димерный мурамилпептид диГМтетра по чувствительности к ингибиторам был сопоставим с ответом на мономерный ГМтри, однако обладал некоторыми особенностями. Во-первых, ответ на диГМтетра подавлялся дайнасором приблизительно на 40%, хотя тот же ингибитор не оказывал достоверного эффекта на продукцию ФНО, индуцированную ГМтри. Это указывает на более значимую роль клатрин-зависимого эндоцитоза в поглощении диГМтетра по сравнению с ГМтри.

Во-вторых, ответ МФ на диГМтетра подавлялся ингибиторами протеаз, что указывает на роль пептидазного процессинга в механизмах действия димерных мурамилпептидов. Можно предположить, что диГМтетра не способен проникнуть через мембрану эндосом и/или активировать NOD-рецепторы, однако такими свойствами обладают фрагменты расщепления диГМтетра, такие как ГМтетра, ГМтри и ГМДП. Не исключено, что и мономерные мурамилпептиды подвергаются дальнейшему процессингу с расщеплением на углеводную и пептидную части, из которых только последняя проникает в цитозоль [14]; эта возможность в настоящей работе не исследована.

В-третьих, ответ МФ на диГМтетра более эффективно подавлялся генистеином и SB203580, чем ответ на ГМтри. Это может быть обусловлено тем, что диГМтетра является менее мощным активатором NOD1 и RIP2.

Учитывая данные настоящего исследования и литературы, в активации МФ, индуцированной компонентами препарата «Полимурамил», можно выделить минимум три стадии. Первые две из них протекают пассивно и включают клатрин-зависимый эндоцитоз мурамилпептидов и пептидазный процессинг димерного мурамилпептида диГМтетра. Третья стадия – активная – состоит в активации сигнальной цепочки «RIP2 – IKK – NF-κB».

## Благодарность

Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «Корус Фарм».

## Список литературы

1. Пашенков М.В., Попилук С.Ф., Алхазова Б.И., Львов В.Л., Феденко Е.С., Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммунобиологические свойства мурамилпептидных фрагментов пептидогликана грамотрицательных бактерий // Иммунология. – 2010. – Т. 31. – С. 119-125.
2. Пашенков М.В., Будихина А.С., Голубева Н.М., Алхазова Б.И., Елисютина О.Г., Львов В.Л., Феденко Е.С., Пинегин Б.В., Хаитов Р.М. Результаты I фазы клинических испытаний иммуномодулятора «Полимурамил» // Иммунология. – 2011. – Т. 32. – С. 239-243.
3. Пашенков М.В., Будихина А.С., Голубева Н.М., Алхазова Б.И., Львов В.Л., Ступин В.А., Привиденцев А.И., Трушин С.Н., Селиверстов Д.В., Огорельцев А.Ю., Пинегин Б.В., Хаитов Р.М. Клиническая и иммунологическая эффективность иммуномодулятора Полимурамил при гнойной хирургической инфекции // Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. – 2011. – Т. 15. – С. 12-18.
4. Billmann-Born S., Till A., Arlt A., Lipinski S., Sina C., Latiano A., Annese V., Hasler R., Kerick M., Manke T., Seegert D., Hanidu A., Schafer H., van Heel D., Li J., Schreiber S., Rosenstiel P. Genome-wide expression profiling identifies an impairment of negative feedback signals in the Crohn's disease-associated NOD2 variant L1007fsinsC // J. Immunol. – 2011. – Vol. 186. – P. 4027-4038.
5. Chamailard M., Hashimoto M., Horie Y., Masumoto J., Qiu S., Saab L., Ogura Y., Kawasaki A., Fukase K., Kusumoto S., Valvano M.A., Foster S.J., Mak T.W., Nunez G., Inohara N. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid // Nat. Immunol. – 2003. – Vol. 4. – P. 702-707.
6. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamailard M., Labigne A., Thomas G., Philpott D.J., Sansonetti P.J. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278. – P. 8869-8872.
7. Girardin S.E., Travassos L.H., Herve M., Blanot D., Boneca I. G., Philpott D.J., Sansonetti P.J., Mengin-Lecreulx D. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2 // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278. – P. 41702-41708.
8. Godl K., Wissing J., Kurtenbach A., Habenberger P., Blencke S., Gutbrod H., Salassidis K., Stein-Gerlach M., Missio A., Cotten M., Daub H. An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors // Proc Natl Acad Sci USA. – 2003. – Vol. 100. – P. 15434-15439.

9. Huang T.T., Feinberg S.L., Suryanarayanan S., Miyamoto S. The zinc finger domain of NEMO is selectively required for NF-kappa B activation by UV radiation and topoisomerase inhibitors // *Mol. Cell Biol.* – 2002. – Vol. 22. – P. 5813-5825.
10. Kagan J. C., Su T., Horng T., Chow A., Akira S., Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta // *Nat. Immunol.* – 2008. – Vol. 9. – P. 361-368.
11. Kanneganti T.D., Lamkanfi M., Kim Y.G., Chen G., Park J.H., Franchi L., Vandenabeele P., Nunez G. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling // *Immunity.* – 2007. – Vol. 26. – P. 433-443.
12. Kersse K., Bertrand M.J., Lamkanfi M., Vandenabeele P. NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2011. – Vol. 22. – P. 257-276.
13. Leber J.H., Crimmins G.T., Raghavan S., Meyer-Morse N.P., Cox J.S., Portnoy D.A. Distinct TLR- and NLR-mediated transcriptional responses to an intracellular pathogen // *PLoS Pathog.* – 2008. – Vol. 4. – P. e6.
14. Lee J., Tattoli I., Wojtal K.A., Vavricka S.R., Philpott D.J., Girardin S.E. pH-dependent internalization of muramyl peptides from early endosomes enables Nod1 and Nod2 signaling // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 23818-23829.
15. Macia E., Ehrlich M., Massol R., Boucrot E., Brunner C., Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin // *Dev. Cell.* – 2006. – Vol. 10. – P. 839-850.
16. Marina-Garcia N., Franchi L., Kim Y.G., Hu Y., Smith D.E., Boons G.J., Nunez G. Clathrin- and dynamin-dependent endocytic pathway regulates muramyl dipeptide internalization and NOD2 activation // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182. – P. 4321-4327.
17. Marina-Garcia N., Franchi L., Kim Y.G., Miller D., McDonald C., Boons G.J., Nunez G. Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2 // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 180. – P. 4050-4057.
18. Masumoto J., Yang K., Varambally S., Hasegawa M., Tomlins S.A., Qiu S., Fujimoto Y., Kawasaki A., Foster S.J., Horie Y., Mak T.W., Nunez G., Chinnaiyan A.M., Fukase K., Inohara N. Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment in vivo // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203. – P. 203-213.
19. Meshcheryakova E., Makarov E., Philpott D., Andronova T., Ivanov V. Evidence for correlation between the intensities of adjuvant effects and NOD2 activation by monomeric, dimeric and lipophylic derivatives of N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl peptides // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25. – P. 4515-4520.
20. Nardin A., Lefebvre M.L., Labroquere K., Faure O., Abastado J.P. Liposomal muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine: Targeting and activating macrophages for adjuvant treatment of osteosarcoma // *Curr Cancer Drug Targets.* – 2006. – Vol. 6. – P. 123-133.
21. Park J.H., Kim Y.G., McDonald C., Kanneganti T.D., Hasegawa M., Body-Malapel M., Inohara N., Nunez G. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178. – P. 2380-2386.
22. Pashenkov M.V., Popilyuk S.F., Alkhazova B.I., L'vov V.L., Murugin V.V., Fedenko E.S., Khaitov R.M., Pinegin B.V. Muropeptides trigger distinct activation profiles in macrophages and dendritic cells // *Int. Immunopharmacol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 875-882.
23. Tigno-Aranjuez J.T., Asara J.M., Abbott D.W. Inhibition of RIP2's tyrosine kinase activity limits NOD2-driven cytokine responses // *Genes Dev.* – 2010. – Vol. 24. – P. 2666-2677.
24. Ting J.P., Duncan J.A., Lei Y. How the noninflammasome NLRs function in the innate immune system // *Science.* – 2010. – Vol. 327. – P. 286-290.
25. Trajkovic V., Samardzic T., Stosic-Grujicic S., Ramic Z., Mostarica Stojkovic M. Muramyl dipeptide potentiates cytokine-induced activation of inducible nitric oxide synthase in rat astrocytes // *Brain Res.* – 2000. – Vol. 883. – P. 157-163.
26. Vallabhapurapu S., Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system // *Ann. Rev. Immunol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 693-733.
27. Vavricka S.R., Musch M.W., Chang J.E., Nakagawa Y., Phanvijhitsiri K., Waypa T.S., Merlin D., Schneewind O., Chang E.B. hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells // *Gastroenterology.* – 2004. – Vol. 127. – P. 1401-1409.
28. Vinnitskii L.I., Buniatian K.A., Pinegin B.V., Mironova E.V., Shvets L.I., Volkov A.A., Inviaeva E.V., Andronova T.M., Khaitov R.M. Domestic immunomodulator of a new generation, Licopid, in the comprehensive therapy and prevention of infectious complications in surgery // *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* – 1997. – P. 46-49.

29. Voss E., Wehkamp J., Wehkamp K., Stange E.F., Schroder J.M., Harder J. NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2 // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281. – P. 2005-2011.

30. West M.A., Bennet T., Seatter S.C., Clair L., Bellingham J. LPS pretreatment reprograms macrophage LPS-stimulated TNF and IL-1 release without protein tyrosine kinase activation // J. Leukoc. Biol. – 1997. – Vol. 61. – P. 88-95.

31. Windheim M., Lang C., Peggie M., Plater L.A., Cohen P. Molecular mechanisms involved in the regulation of cytokine production by muramyl dipeptide // Biochem. J. – 2007. – Vol. 404. – P. 179-190.

*поступила в редакцию 10.07.2012*

*отправлена на доработку 04.08.2012*

*принята к печати 12.08.2012*