

Новые достижения в исследовании молекулярного механизма действия мурамилпептидов

Р. Бомфорд (Великобритания)

В рамках данного обзора мне хотелось бы рассказать о новых важных открытиях, сделанных в лабораториях Франции и Японии, которые дают нам представление о клеточном рецепторе к мурамилдипептидам и о внутриклеточных событиях, разворачивающихся после присоединения мурамилдипептида к рецептору. Результаты последних экспериментов являются очень важными для дальнейшей научной разработки мурамилдипептидов и применения их в клинической практике.

Разрешите напомнить вам историю открытия мурамилдипептидов. Все началось в 1974 году в Институте Пастера во Франции, когда французский ученый Ledgerer успешно выделил активный адьювантный компонент микобактерии – мурамилдипептид (МДП), состоящий из одной молекулы сахара и двух аминокислот. Впоследствии в Москве в Институте биоорганической химии группа ученых под руководством профессора В.Т. Иванова и доктора Т.М. Андроновой выделили из других бактерий – *Lactobacillus bulgaricus* – МДП, который был идентичен выделенному французами за исключением одной характеристики: он содержал еще одну молекулу сахара – N-ацетилглюкозамин. В связи с этим данное соединение получило название глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП). ГМДП имел одно весомое преимущество: он обладал иммуностимулирующей активностью и при этом был гораздо менее токсичным, чем МДП микобактерий. Это определило возможность использования ГМДП в клинической практике.

Ясно, что следующим шагом на пути к клиническому внедрению препарата было производство больших количеств данного вещества. И группа ученых под руководством доктора Т.М. Андроновой успешно разработала новый метод синтеза. При этом дисахарид выделяют из клеточной стенки бактерий, следовательно, это - натуральный продукт. Дипептид получают методами химического синтеза. В последующем соединяют две молекулы. Таким образом, была решена проблема получения высокоочищенного вещества со стандартными характеристиками в промышленных масштабах. В настоящее время фирма «ПЕПТЕК» производит и продает ГМДП под торговым названием «ЛИКОПИД». Препарат зарегистрирован в России

и может применяться по различным показаниям, главным образом, при инфекционных заболеваниях, но также и при аутоиммунном заболевании кожи – псориазе. И особенно важно то, что этот препарат активен при приеме внутрь, его не нужно вводить парентерально.

В ходе разработки мурамилдипептида для использования в клинической практике перед нами и другими исследователями вставали одни и те же вопросы: «Как этот препарат работает на клеточном уровне? Каков его рецептор? И что происходит внутри клетки?» И всякий раз с сожалением приходилось признавать, что мы не знаем этого. В этом заключался серьезный недостаток.

Это был такой важный вопрос, что многие лаборатории пытались найти рецептор для мурамилпептидов. Поначалу все полагали, что это может быть рецептор, находящийся на поверхности клетки. Было проведено множество экспериментов с использованием классического метода радиоактивного мечения мурамилдипептида. При применении данной методики можно определить количество и аффинность рецепторов на клеточной поверхности. Но эти эксперименты не дали хороших результатов.

Было установлено, что, по-видимому, имеется очень малое количество рецепторов на поверхности клетки, и было трудно определить их специфичность. Одна группа американских ученых сообщила, что рецептор к мурамилдипептидам относится к группе серотониновых рецепторов, однако больше никому не удалось воспроизвести или развить эти результаты.

Следовательно, альтернативным вариантом было предположение, что рецептор может находиться внутри клетки, что это внутриклеточный рецептор. В 1991 году группа профессора В.А. Несмеянова в Институте биорганической химии сделала важное наблюдение. Посредством разрушения клетки им удалось обнаружить рецептор с полной специфичностью к мурамилдипептидам внутри клетки.

Но природа этого рецептора оставалась неясной в течение одиннадцати лет до 2003 года, когда, как уже упоминалось, одна группа ученых в Институте Пастера во Франции и одна группа ученых в Японии получили сходные результаты. Обе эти группы идентифицировали внутриклеточный рецептор к мурамилдипептидам как молекулу, называемую NOD2.

NOD2 относится к достаточно многочисленному семейству белков, характерным признаком которых является наличие в их составе домена нуклеотидсвязывающей олигомеризации. NOD белки были впервые обнаружены не у человека, а у растений и червей - нематод. Их наличие было связано с устойчивостью к инфекциям. Впоследствии, у человека также было выявлено более 20 генов, кодирующих 4 гомологичных NOD-белка.

Все NOD-белки помимо домена нуклеотидсвязывающей олигомеризации содержат С-концевой участок, который отвечает за распознавание лиганда (в случае NOD2 лигандом является мурамилдипептид), и N-концевой домен, отвечающий за передачу информации сигнальным молекулам и факторам транскрипции в ядре.

NOD2 рецептор экспрессируется фагоцитирующими клетками – моноцитами, гранулоцитами, дендритными и эпителиальными клетками. Все эти клетки относятся к врожденной иммунной системе и участвуют в развитии иммунного ответа. Иначе говоря, месторасположение белка подчеркивает его непосредственное участие в иммунном ответе.

Целая серия экспериментов продемонстрировала, что распознавание мурамилдипептидов белком NOD2 является строго стереоспецифичным. Природный мурамилдипептид и полусинтетический ГМДП (Ликопид), являясь активными лигандами, вызывающими ответ клеток. Дисахарид, не содержащий дипептида, не обладает активностью. Если происходят изменения аминокислот в составе дипептида, например, если L-изомер аланина заменить на D-изомер, то это также приводит к потере активности. И, наоборот, если D-изомер изоглутамила заменить на L-изомер, то это снижает активность препарата. Таким образом, очевидно, что распознавание мурамилдипептидов белком NOD2 крайне стереоспецифично.

Опираясь на последние экспериментальные данные, мы, наконец, имеем возможность описать серию событий, происходящих в организме при проникновении МДП-содержащих патогенов. Итак, бактерии поглощаются фагоцитами и погружаются в фаголизосому, что ведет к деградации пептидогликана, входящего в состав их клеточной стенки. Так мурамилдипептиды проникают в клетку. Они связываются с С-концевым доменом белка NOD2, затем происходит передача сигнала из эффекторного домена, что вызывает активацию фактора транскрипции NF- κ B, который проникает в ядро и включает гены, кодирующие цитокины. Вследствие этого клетка начинает секретировать тот тип цитокинов, который, как нам известно, и стимулируется мурамилдипептидами – ИЛ-1, ФНО- α , ИЛ-12. Эти цитокины способны стимулировать Т-лимфоциты и/или вызывать активацию макрофагов. Очевидно, что природный МДП и ГМДП (Ликопид) действуют аналогичным образом.

Некоторые аспекты до сих пор остаются неясными. Например, мы не знаем, как пептидогликан, МДП или ГМДП проходит через клеточную мембрану или мембраны внутриклеточных органелл. Возможно, существуют какие-то молекулы, участвующие в переносе. Но они до сих пор не исследованы. Тем не менее важно, что был установлен главный принцип, сви-

детельствующий о том, что рецептор для этих веществ внутриклеточный, что это белок NOD2, и он активирует транскрипционный фактор NF-κB.

Существует и еще один важный аспект, которого следует коснуться в этом обзоре. Молекула NOD2 участвует в качестве эффектора в патогенезе такого воспалительного заболевания кишечника как болезнь Крона. Было идентифицировано три мутации белка NOD2. Все они приводят к потере способности рецептора к распознаванию мурамилдипептидов и повышают риск развития болезни Крона. До сих пор точный механизм взаимосвязи этих двух событий остается неизвестен. Тем не менее специалисты по болезни Крона выдвинули несколько гипотез.

В соответствии с одной из них, пептидогликаны и мурамилдипептиды постоянно проникают через эпителий и поступают к антиген-представляющим клеткам в стенке кишечника. В физиологических условиях эти вещества взаимодействуют с NOD2, в результате чего образуются предварительно подготовленные, кондиционированные антиген-представляющие клетки, оказывающие гомеостатическое действие и способствующие пролиферации регуляторных CD4-лимфоцитов, которые не вызывают воспаления.

Однако в случае возникновения мутаций белка NOD2 мурамилдипептиды не могут связаться с ним. Вероятно, в таком случае антиген-представляющие клетки получают стимулирующий сигнал от других молекул, что вызывает стимуляцию CD4-лимфоцитов, ответственных за развитие аутоиммунного заболевания, болезни Крона.

Следует подчеркнуть, что это только гипотеза, но она отражает главные и самые важные идеи. Первая из них заключается в постоянной стимуляции иммунной системы мурамилдипептидами из кишечника. При этом, конечно же, необходимо учитывать, что Ликопид назначается энтерально, внутрь. Таким образом, Ликопид может вносить свой вклад в стимуляцию на уровне кишечника.

Вышеизложенный материал ясно показывает, что мурамилдипептиды могут иметь регуляторный эффект при аутоиммунных заболеваниях. И в то время, когда мы разрабатывали мурамилдипептиды для лечения псориаза, мы не имели ясного представления, каковы регуляторные механизмы действия иммуностимулятора при воспалительном заболевании и как иммуностимулятор может уменьшать воспаление.

Возможно, данные представления помогают нам понять, что иммуномодулятор связывается с NOD-белком определенного типа клеток, которые затем вызывают развитие регуляторных Т-клеток в большей степени, чем Т-лимфоцитов, стимулирующих воспаление.

В заключение разрешите мне сделать несколько выводов. Теперь мы знаем, что представляет собой рецептор для мурамилдипептидов. Возможно, существуют и другие рецепторы, но хотя бы один из них четко охарактеризован. Он является внутриклеточным. Он представляет семейство молекул, каждая из которых отвечает за различные механизмы противоинфекционной защиты. У нас есть хорошая тест-система для исследования мурамилдипептидов. Она будет очень полезна для рационального развития и изучения новых веществ – агонистов и антагонистов.

Нам известны мутации NOD2, при которых мурамилдипептид не может связаться с этим белком, что вызывает болезнь Крона. Я буду очень удивлен, если мы в будущем не обнаружим и других мутаций белков NOD2, играющих роль в патогенезе других заболеваний. Я не являюсь экспертом в области туберкулеза, я могу только предполагать, что высвобождение пептидогликана и мурамилдипептидов из микобактерий в очаге туберкулезного повреждения и их взаимодействие с белком NOD2 является крайне важным для иммунорегуляции роста микобактерий при туберкулезе.