

ЧТО ТАКОЕ ЦИТОКИНЫ, И ЧЕМ ОНИ ПОЛЕЗНЫ, ВРЕДНЫ ИЛИ ВЫГОДНЫ.

С. А. Недоспасов

Институт Молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН,
Московский Государственный Университет им. Ломоносова,
Москва

ВВЕДЕНИЕ

Цитокины - медиаторы клеточных коммуникаций, составная часть молекулярных механизмов гомеостаза и иммунитета, как врожденного, так и адаптивного. Цитокины это белковые молекулы, которые продуцируются всеми клетками - не только гематопоезического, но и стромального происхождения. Цитокины могут действовать на те же или на другие клетки через специфические рецепторы, запуская каскады внутриклеточной сигнализации, которые могут приводить к активации или репрессии клеток, запуску программ дифференцировки или пролиферации, а также программируемой клеточной гибели. Цитокины могут действовать дистально и системно (как это делают гормоны, причем цитокины структурно родственны некоторым классам белковых гормонов), но могут действовать местно, и даже только на те клетки, которые находятся в непосредственном контакте с клеткой продуцентом, а также аутокринно. Одни цитокины секретируются, другие закорены на мембране клетки-продуцента, и только при определенных условиях могут быть высвобождены. В отдельную группу выделяют цитокины, регулирующие миграцию клеток, - так называемые хемотактические цитокины, или хемокины. Хемокинов известно много десятков. Примерно такое же число составляют изученные не-хемотактические цитокины.

Наука о цитокинах кроме важного фундаментального вклада в молекулярную и клеточную биологию и иммунологию сыграла огромную роль для медицины и биотехнологической промышленности.

ЦИТОКИНЫ И ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА.

Напомним общие принципы передачи сигнала от цитокинов через цитокиновые рецепторы. Именно по типу передаваемого сигнала (что прямо связано со структурой *внутриклеточной* части рецептора) и следует классифицировать многочисленные семейства клеточных рецепторов цитокинов. При этом, некоторые структурные и биохимические парадигмы, лежащие в основе механизмов передачи внутриклеточного сигнала, справедливы и для не-цитокиновых рецепторов.

У большинства цитокиновых рецепторов (кроме хемокиновых, об этом – дальше) передача сигнала основана на серии высокоаффинных белок-белковых взаимодействий в цитоплазме с участием адаптерных белков (в некоторых случаях адаптерные белки обладают белок-киназными активностями). В результате конформационных изменений в молекуле рецептора под действием связавшегося цитокина происходит одно из следующих событий:

(а) сближаются цитоплазматические домены рецепторов, которые обычно состоят из 2 или 3 отдельных полипептидных цепей (субъединиц). В результате образуется новая трехмерная молекулярная поверхность (иногда используют термин «молекулярная платформа»), на которую с большим сродством присоединяются специфичные для данного вида сигнализации адаптерные белки. В некоторых случаях адаптерные белки уже предассоциированы с рецептором, но связывание цитокина сближает их так же, как сближает сами субъединицы рецептора, с образованием новых

платформ, на которую могут быть рекрутированы адаптерные белки «второй волны» или белок-киназы.

(б) адаптерный белок может иметь киназную активность (обычно – способность фосфорилировать другие белки по тирозину) и после сближения эта активность индуцируется, что приводит к специфическому фосфорилированию цитоплазматических частей рецептора или адаптерных молекул, или того и другого. Наличие заряженной и достаточно крупной фосфатной группы приводит к изменениям молекулярных поверхностей белкового комплекса, у которых появляется сродство к следующему белку сигнального каскада (это может быть адаптерный белок «второй волны», киназа или предшественник транскрипционного фактора).

При изучении сигнализации рецепторов иммунной системы (как клеточно-мембранных, так и цитоплазматических) были открыты белковые модули, которым свойственна гомотипическая олигомеризация (по принципу «подобное липнет к подобному»), причем такая олигомеризация, во-первых, приводит к образованию новых молекулярных платформ, а, во-вторых, если адаптерный белок имеет 2 таких (но разных!) модуля, он может одним модулем связываться с предсуществующим комплексом, а другим – рекрутировать в комплекс следующие белки сигнального каскада.

Некоторые такие модули (которых получили «звонкие» названия, например «домены смерти») участвуют как в передаче сигнала для активации транскрипционных факторов, так и в активации каспаз, особого вида протеаз. Последние способны запускать каскады программируемой клеточной смерти, хотя в случае каспазы-1 важным для механизмов врожденного иммунитета событием является расщепление предшественника ИЛ-1бета, который после секреции запускает специальный провоспалительный каскад.

Кроме того, одним из относительно недавно понятых общих механизмов внутриклеточной регуляции является регулируемая деградация белков, причем одним из «поцелуев смерти» для белка является присоединение убиквитина. В большинстве сигнальных путей имеются белки-регуляторы, которые по умолчанию ингибируют дальнейшую передачу сигнала. Соответственно, их деградация в результате регулируемого убиквитинирования может приводить к активации сигнального каскада.

Упрощенно активационный каскад от рецепторов многих цитокинов можно представить следующим образом:

Цитокин→рецептор→изменение молекулярных платформ для белок-белковых взаимодействий в цитоплазматической части рецептора→рекрутирование адаптерных белков→активация сигнальных киназ→образование в цитоплазме транскрипционных факторов→их транслокация в ядро и активация генов-мишеней. Поскольку часть генов-мишеней.....

В других случаях рецепторы могут обходиться без дополнительных адаптерных белков и непосредственно привлекать и связывать киназы (например, JAK киназы) на своих цитоплазматических доменах. Наконец, существует несколько семейств рецепторов, которые содержат киназные активности (тирозиновую или серин-треониновую) прямо внутри своих цитоплазматических доменов. Механизмы дальнейшей передачи сигнала у таких рецепторов, как правило, отличаются от приведенной выше парадигмы.

Теперь рассмотрим примеры конкретных семейств рецепторов и особенности их сигналинга.

Семейство рецепторов ИЛ-1-подобных цитокинов.

Система цитокина ИЛ1 (в действительности, три цитокина: ИЛ1 альфа и – гораздо более важный – ИЛ-1бета, и «блокирующий» лиганд, называемый антагонистом рецептора, ИЛ-1РА) вкупе с рецепторами семейства ИЛ-1, а также системы ИЛ-18 и ИЛ-33, имеют прямое сходство с механизмами передачи сигнала в одной из центральных ветвей врожденного иммунитета – TLR рецепторах. Подмножеством важных регуляторных и эффекторных генов, активируемых при врожденном иммунном ответе, также являются гены цитокинов: например, провоспалительных (таких, как ФНО, ИЛ-6 или тот же ИЛ-1) или хемотактических (таких, как ИЛ-8 или MCP1). После продукции цитокины действуют на те же или другие клетки (аутокринно, паракринно или системно) через специфические рецепторы.

По сути, передача сигнала от этих рецепторов совпадает с таковым для большинства TLR (кроме TLR3). Главной адаптерной молекулой является MyD88, который рекрутируется на TIR домен внутриклеточной части рецептора. Через короткий каскад, включающий IRAK и TRAF6 активируются сигнальные киназы комплекса IKK. Мишенью этого комплекса является ингибитор NFkB (IkB), который после фосфорилирования получает «поцелуй смерти» в виде убиквитина и деградирует. Главными транскрипционными факторами являются димеры белков NFkB.

Рецепторы, рекрутирующие белок-киназы.

Значительная часть цитокиновых рецепторов, в частности, рецепторы интерферонов, и большинства интерлейкинов используют так называемый JAK-STAT сигнальный каскад. Имеется 4 вида тирозиновых белок-киназ семейства JAK (только одна из них, JAK3, экспрессируется преимущественно в клетках иммунной системы, остальные экспрессируются во всех типах клеток) и 7 субъединиц

транскрипционных факторов семейства STAT. JAK киназы конститутивно рекрутированы на внутриклеточные домены рецепторов, причем до связывания цитокина с рецептором они сами не фосфорилированы. После активации рецепторов киназы (предположительно сидящие на отдельных цепях рецепторного комплекса) сближаются, активируются (по принципу «активации, индуцированной близостью» - proximity-induced activation) и фосфорилируют друг друга, а также тирозиновые остатки в цитоплазматических доменах рецепторов. На измененную в результате этих модификаций платформу рекрутируются молекулы-предшественники транскрипционных факторов семейства STAT, которые сами по себе не активны. На активированной рецепторно-киназной платформе они фосфорилируются по тирозиновым остаткам киназами JAK, причем после фосфорилирования они теряют сродство к рецепторно-киназному комплексу, но приобретают свойство образовывать димеры. Именно такие димеры STAT белков (в некоторых случаях – с присоединением еще одной белковой субъединицы) и становятся полноценными транскрипционными факторами – они транслоцируются в ядро и активируют гены, содержащие соответствующие регуляторные элементы в своих промоторах или энхансерах.

Рецепторы, содержащие «встроенные» белок-киназы.

Кроме рецепторов, непосредственно рекрутирующих белок-киназы на цитоплазматический домен, есть несколько семейств рецепторов, которые сами способны передавать внутриклеточный сигнал фосфорилирования, потому что в их цитоплазматическом домене уже есть встроенные киназы. Представителями наиболее известного семейства таких рецепторов являются рецепторы EGF и PDGF (эпидермального и тромбоцитарного факторов роста), которые

могут стать онкогенами за счет мутации. В таком случае рецептор превращается в конститутивно активную киназу, которая может передавать сигнал в отсутствие цитокина, в результате чего может возникнуть неоплазия. К рецепторам, содержащим встроенные киназы относятся несколько рецепторов гемопозитинов (рецепторы для M-CSF и SCF, а также Flt3). Еще одним семейством, заслуживающим упоминания, являются рецепторы трансформирующего фактора роста TGF-beta, которые содержат встроенные серин-треониновые киназы и сигнализируют по особому механизму, включающему активацию транскрипционных факторов семейства SMAD, которые (аналогично белкам STAT) находятся в цитоплазме, а после активации димеризуются и транслоцируются в ядро.

Семейство рецепторов ФНО-подобных цитокинов.

Фактор некроза опухолей первоначально был открыт в связи со своими противоопухолевыми эффектами, но впоследствии оказался чрезвычайно важным и плеiotропным цитокином. Эти свои функции ФНО осуществляет через клеточный рецептор p55 (TNFR1), который экспрессируется на многих типах клеток, что и объясняет плеiotропность действия ФНО. В частности, ФНО является одним из трёх главных провоспалительных цитокинов (наряду с ИЛ-1 и ИЛ-6) и его синтез запускается буквально через минуты после активации многих рецепторов врожденного иммунитета (в частности, рецепторов семейства TLR). Другой важнейший рецептор этого семейства – Fas (так же называемый Apo-1, или CD95), который запускает программу инструктивного апоптоза и является одним из центральных регуляторов гомеостаза клеток иммунной системы.

Рецепторы этого семейства образуют гомотримеры, после того, как они связываются с соответствующими цитокинами также находящимися в тримерной форме. 5 рецепторов семейства ФНО (в

том числе Fas и TNFR1) содержат во внутриклеточной части так называемые «домены смерти». Эти белковые модули рекрутируют специальные адаптерные белки, которые, в свою очередь, могут рекрутировать и активировать предшественники каспаз – особый класс протеаз участвующих в программируемой клеточной гибели.

Рецепторы семейства ФНО (как содержащие, так и не содержащие «домены смерти») сигнализируют аналогично (но не идентично) рецепторам семейства ИЛ-1 и TLR. Через свою систему адаптерных молекул они рекрутируют и активируют сигнальные киназы, которые в конечном итоге активируют факторы транскрипции двух важнейших семейств: NF κ B и AP-1.

Рецепторы хемотактических цитокинов (хемокинов).

Этот важнейший класс рецепторов регулирует миграцию многих типов клеток, в том числе и клеток регулирующих врожденный иммунитет, и осуществляющих эффекторные функции. Структура и механизм передачи сигнала в этих рецепторах очень древний, и реализуется как в системах движения микроорганизмов, так и при фотосинтезе. Это – так называемые родопсин-подобные рецепторы, 7 раз пронизывающие клеточную мембрану и сигнализирующие через G-белки, которые рекрутируются и активируются цитоплазматическими доменами рецепторов после конформационных изменений, вызванных связыванием лиганда. В отличие от большинства рассмотренных выше семейств рецепторов, рецепторы хемокинов не передают транскрипционного сигнала, а через ГТФазы сигнализируют на систему цитоскелета, перестройки которого и ответственны за поляризацию клетки и за появление способности «ползти» в направлении градиента концентрации хемокина. Другие сигнальные каскады от этих рецепторов задействуют фосфолипазу C (PLC), которая в конечном итоге активирует MAP киназы и PKC. Хемокиновых рецепторов очень

много (около 20), а хемокинов – еще больше (более 100). С помощью переключения экспрессии хемокиновых рецепторов осуществляются такие важнейшие процессы при иммунном ответе, как привлечение нейтрофилов и моноцитов в очаг первичной инфекции, или миграция дендритных клеток во вторичные лимфодные органы для встречи с Т клетками, причем вероятность этого события многократно усиливается тем, что и Т клетки, и дендритные клетки на определенном этапе экспрессируют один и тот же вид рецептора (что и позволяет им встретиться).

Кроме хемокинов, отвечающих за миграцию клеток в ходе иммунного ответа, в частности, при инфекции, существуют гомеостатические хемокины, обеспечивающие планомерное и регулируемое наполнение лимфоидных органов клетками иммунной системы.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ЦИТОКИНОВ.

Поскольку цитокины являются медиаторами важнейших функций организма, таких как защита от инфекций или кроветворение, не удивительно, что как только соответствующие гены человека были клонированы, многочисленные биотехнологические компании начали разрабатывать терапевтические препараты на их основе. Наибольший начальный успех пришел к разработчикам рекомбинантных интерферонов первого типа (альфа, существующий во многих вариантах, и бета, существующий в единственном варианте). Противовирусные свойства интерферонов были известны давно, но только технология рекомбинантных ДНК сделала возможным, начиная с 80-х годов прошлого века, массовое применение лекарств на основе интерферонов. Интересно, что они применяются не только для лечения вирусных инфекций, но и для лечения таких болезней как рассеянный склероз, связь которого с вирусами не установлена.

Примерно в те же годы были разработаны лекарства на основе гормона роста человека и животных, которые по характеру передачи внутриклеточного сигнала подобны цитокинам – интерлейкинам и интерферонам.

Однако самое большое клиническое применение нашли некоторые гематопоетические факторы, контролирующие образование определенных типов кроветворных клеток (значительная часть которых является клетками иммунной системы). Рекордсменами являются фактор дифференцировки и роста нейтрофилов (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, Г-КСФ) и эритропоэтин. Их применение только в онкологических клиниках спасло жизни миллионов пациентов и позволило врачам применять более эффективные схемы лекарственной противоопухолевой терапии. Эритропоэтин применяется не только для поддержания кроветворения у больных, но и для искусственного увеличения количества красных клеток у спортсменов. Скандалы, связанные со злоупотреблением этим препаратом, привели к аннулированию нескольких олимпийских и мировых рекордов и дисквалификации многих знаменитых спортсменов. Это при том, что предсоревновательная подготовка в условиях высокогорья приводит к качественно сходным результатам и не запрещена.

Интересно, что функционально сходные факторы кроветворения, такие как ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) или М-КСФ (макрофагальный колониестимулирующий фактор), применяются значительно меньше. Одна из главных областей применения ГМ-КСФ – вакцины, в том числе противоопухолевые, использующие собственные клетки пациента, их культивирование и активацию *in vitro* с последующим адоптивным переносом.

Выше отмечалось, что многие цитокины плеiotропны, т.е. действуют на разные клетки, в разных гистологических компартментах и в разных патофизиологических ситуациях. Это свойство цитокинов неожиданно проявило себя в клинике с отрицательной стороны – оказалось, что многие из важных и «полезных» цитокинов токсичны при системном применении. Токсичностью отличаются цитокины самых разных групп, от интерферона-гамма, до многих интерлейкинов и фактора некроза опухолей.

АНТИ-ЦИТОКИНОВАЯ ТЕРАПИЯ.

Причины токсичности цитокинов не ограничиваются их плеiotропностью. Были найдены заболевания, главным образом с воспалительным компонентом, патогенез которых связан с аномально высокой экспрессией некоторых цитокинов, причем таких, которые при нормальных уровнях экспрессии выполняют важные защитные функции. Так, три главных провоспалительных цитокина – ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО – связаны с некоторыми тяжелыми аутоиммунными заболеваниями, такими как артрит, болезнь Бехтерева, подагра, псориаз, и другие. Более того, хроническое воспаление, связанное с повышенными уровнями экспрессии этих цитокинов, повышает риск раковых заболеваний.

На основании этих данных в середине 90-х годов были сформулированы представления об анти-цитокиновой терапии, при которой лекарственный препарат представлял собой не рекомбинантный цитокин, а его блокатор (на основе моноклональных антител или растворимых рецепторов). Несмотря на то, что множественность цитокинов со сходными свойствами (только провоспалительных цитокинов – десятков) как будто не позволяла надеяться на терапевтические эффекты блокировки одного-единственного цитокина, действительность превзошла все ожидания.

Сегодня миллионы людей, страдающих такими тяжелыми хроническими заболеваниями, как ревматоидный артрит, успешно лечат блокаторами ФНО или ИЛ-6. Ряд заболеваний, таких как подагра, лечат блокатором ИЛ-1. Фундаментально-научное значение успеха анти-цитокиновой терапии состоит в осознании невырожденности физиологических функций индивидуальных цитокинов.

К сожалению, около 30% больных артритом резистентны к анти-цитокиновой *монотерапии*. Поэтому с большим нетерпением ожидаются клинические испытания комбинированной терапии, при которой будет блокироваться несколько противовоспалительных цитокинов (например, ФНО и ИЛ-6).

ЭКОНОМИКА ЦИТОКИНОВОЙ И АНТИ-ЦИТОКИНОВОЙ ТЕРАПИИ.

Эффект коммерциализации знаний о цитокинах превосходит все мыслимые ожидания и представления. Так, ежегодные продажи лекарств на основе интерферонов в США и Западной Европе – около 7 млрд. долларов в год (значительную часть составляют продажи бета-интерферона, в первую очередь, из-за использования при терапии рассеянного склероза). Г-КСФ и эритропоэтин – более 15 млрд. долларов в год! Продажи гормона роста человека, который по структуре аналогичен цитокинам, составляют около 2 млрд. долларов в год. Все эти цифры не учитывают продаж аналогов этих цитокинов в тех странах, в которых западные патентные законы не работают в полном объеме. Кроме того, в некоторых странах налажено полулегальное производство и экспорт этих и подобных лекарств, так что полные объемы продаж могут оказаться существенно выше.

Отметим, что рекомбинантные цитокины животных все шире применяются в ветеринарии, они действуют аналогично цитокинам человека.

Может показаться парадоксальным, но по объему продаж и своему экономическому эффекту анти-цитокиновая терапия может превзойти успех применения цитокинов. Дело в том, что заболевания, при которых показана анти-цитокиновая терапия, носят хронический характер, и лекарства должны применяться долгие годы, или даже всю оставшуюся жизнь. Эта ситуация исключительно выгодна для фармацевтических компаний, но ложится тяжелым бременем на медицинские страховки и на самих пациентов. Например, курс анти-ФНО терапии стоит не менее 20 тыс. долларов в год, не все страны могут позволить включить этот вид лечения в «стандартную терапию», которая оплачивается обычной медицинской страховкой. В нашей стране только единицы могут рассчитывать на бесплатное лечение этим классом лекарств.

Считается, что рынок только анти-ФНО лекарств составляет около 20 млрд. долларов в год. Препараты блокирующие ИЛ-6 и ИЛ-1 появились позже, но их рынок неуклонно растет, и составляет не менее 5 млрд. долларов в год. Многие другие анти-цитокиновые препараты (например, блокатор ИЛ-18) находятся в стадии клинических испытаний.