

УДК 577.22

С.І. РОМАНЮК, С.В. КОМІСАРЕНКО

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України
вул. Леонтовича, 9, Київ, 01601, Україна

НАВІЩО ПОТРІБНІ РЕЦЕПТОРНІ ПРОТЕЇНИ НА МЕМБРАНАХ КЛІТИН, АБО ЯК РІЗНІ КЛІТИНИ ОРГАНІЗМУ СПРИЙМАЮТЬ НАВКОЛИШНЄ СЕРЕДОВИЩЕ?

Лауреатами Нобелівської премії з хімії 2012 року стали американські вчені Роберт Лефковіц і Брайан Кобилка за «дослідження рецепторів, зв'язаних з G-протеїнами» (GPCR). GPC-рецептори на поверхні спеціалізованих клітин виконують роль структур розпізнавання специфічних сигналів із середовища, що оточує клітину. Взаємодією з різноманітними позаклітинними ефекторами: гормонами, нейромедіаторами, біоактивними пептидами, іонами, ліками тощо, ці рецептори контролюють велику кількість надзвичайно важливих для функціонування організму процесів. GPCR – це родина подібних за структурною організацією та функцією рецепторів мембран еукаріотичних клітин, які мають сім транс-мембранних доменів і передають усередину клітини сигнал завдяки активації GTP-зв'язаних протеїнів (G-протеїнів). Останні активують каскад внутрішньоклітинних реакцій, наслідком яких є відповідь клітини на подразник (чи певний фізіологічний ефект). Дослідження Р. Лефковіца і Б. Кобилки стали фундаментальним внеском у визначення просторової структури GPC-рецепторів та вивчення механізмів їхнього функціонування.

Ключові слова: G-протеїни, рецептори GPCR, Нобелівська премія, Лефковіц, Кобилка.

Сьогодні найцікавіші та найперспективніші наукові роботи виконуються, як правило, на стику або, правильніше, «на перекриттях» традиційних дисциплін, однак Нобелівські премії досі присуджують у чітко розмежованих галузях медицини чи фізіології, фізики та хімії. Намагаючись утримуватися в цих жорстких рамках, Нобелівський комітет усе частіше призначає премію з хімії за досягнення в галузі біохімії, що безпосередньо стосуються фізіології та медицини. Так, 10 жовтня 2012 р. було оголошено, що цьогорічну Нобелівську премію з хімії отримали два американські професори – Роберт Лефковіц з Університету Д'юка в Північній Кароліні та Брайан Кобилка зі Стенфордського університету в Каліфорнії –

за дослідження рецепторів, зв'язаних з G-протеїнами (GPCR – G-protein-coupled receptors). Обидва вчені мають медичну освіту, а за відкриття та вивчення самих G-білків у 1994 р. Альфреду Гілману та Мартіну Родбеллу було присуджено Нобелівську премію з фізіології та медицини.

Роберт Лефковіц (Robert Lefkowitz) народився в 1943 р. у Нью-Йорку в родині єврейських емігрантів з Польщі. У 1962 р. він здобув ступінь бакалавра мистецтв у Колумбійському коледжі при Колумбійському університеті Нью-Йорка, а в 1966 р. у Коледжі загальної терапії та хірургії при тому ж Університеті – ступінь доктора медицини (MD). З 1968 по 1970 р. Р. Лефковіц працював у системі Національних інститутів здоров'я та в Головному госпіталі Массачусетсу в Бостоні (MGH), у 1973–1976 рр. – в Американській

кардіологічній асоціації (American Heart Association). З 1973 р. він співробітник Університету Д'юка, а з 1976 р. — Медичного інституту Говарда Х'юза. У 2007 р. Р. Лефковіц був удостоєний Національної медалі науки (National Medal of Science), яку вручають за указом президента США, й отримав азіатський аналог Нобелівської премії — премію Шоу (Shaw Prize).

Брайан Кобилка (Brian Kobilka) народився в 1955 р. у штаті Міннесота в родині з німецько-польським корінням. Він здобув ступінь бакалавра з біології та хімії в Міннесотському університеті, потім ступінь доктора медицини (MD) на медичному факультеті Єльського університету. Після закінчення інтернатури у Вашингтонському університеті працював у лабораторії Р. Лефковіца, а в 1987–2003 рр. — у Медичному інституті Говарда Х'юза. Нині Б. Кобилка керує лабораторією в Стенфордському університеті. У 2007 р. журнал «Science» назвав його дослідження структури GPCR одним із проривів року.

GPCR-рецептори — це ціла родина подібних за структурною організацією та функцією рецепторів мембран еукаріотичних клітин, які мають сім трансмембранних α -спіралізованих доменів і які передають усередину відповідної клітини сигнал завдяки активації GTP-зв'язаних протеїнів (G-протеїнів), що запускають каскад внутрішньоклітинних реакцій, наслідком яких є відповідь клітини на певний подразник (чи певний фізіологічний ефект). GPCR називають іще серпентиновими рецепторами, оскільки на схемі перетинання плазматичної мембрани клітини GPCR протеїнами розміщення доменів GPCR має «змієподібний» характер. N-кінцевий сегмент рецептора знаходиться на зовнішній стороні плазматичної мембрани клітини, а C-кінцевий — зорієнтований усередину клітини. У геномі людини знайдено близько 800 генів, що кодують різні GPCR. Функція 150 з них залишається невідомою, решта — розпізнають, тобто специфічно взаємодіють з різноманітними лігандами: гормонами, нейромедіаторами, біоактивними пептидами, іонами тощо. Зокрема, ці рецеп-



Роберт ЛЕФКОВІЦ
(Robert LEFKOWITZ)



Брайан КОБИЛКА
(Brian KOBILKA)

тори реагують на такі біологічно активні речовини, як хемокіни, гістамін, серотонін, адреналін, дофамін, опіоїди, канабіноїди, кофеїн і багато інших. Тисячі одорантних рецепторів допомагають ссавцям розпізнавати запахи. Отже, GPCR на поверхні спеціалізованих клітин виконують роль структур розпізнавання специфічних сигналів із середовища, що оточує клітину.

Велика кількість надзвичайно важливих для функціонування організму процесів контролюються GPCR, наприклад, регулювання кров'яного тиску та серцебиття, реагування на небезпеку, відчуття болю чи ейфорії, сприйняття зорових образів або запахів, ембріональний розвиток, навчання і пам'ять тощо. Порушення у функціонуванні GPCR спостерігаються під час багатьох тяжких захворювань, таких як діабет, сліпота, алергія, депресія, серцево-судинні дефекти, деякі форми злоякісного росту. На фармацевтичному ринку від третини до половини всіх ліків становлять препарати, дія яких спрямована на GPCR. Тому дослідження структури цих рецепторів і механізмів передавання ними сигналів у клітинах-мішенях важливі для глибшого розуміння причин багатьох захворювань і створення ефективних ліків з мінімальною побічною дією.

Вивчення GPC-рецепторів розпочалося ще в XIX ст., точніше в 1870 р., коли німецький учений Вільгельм Кюне виявив і виділив родопсин — рецептор, що реагує на світло. Подальше дослідження механізму регулювання скорочення м'язових клітин під впливом певних речовин дало змогу на початку 70-х років XX ст. дійти висновку, що існує деяка рецепторна субстанція, яка реагує на позаклітинні молекули і передає сигнали всередину клітини.

Метою роботи Роберта Лефковіца і став пошук цієї рецепторної субстанції, для чого він використав радіоактивно мічений адреналін. На той момент про клітинні рецептори було відомо вже досить багато. У 1960-х рр. було виявлено, що дія адреналіну на клітини опосередковується особливим типом протеїнів — G-протеїнами, які здатні гідролізувати гуанозинтрифосфат (GTP), чим викликають у клітині певні каскади реакцій. Однак як саме це відбувається, залишалось невідомим. На початку 70-х років кілька GPC-рецепторів було ідентифіковано, проте виділити й дослідити їхню структуру (за винятком родопсину) було неможливо через край малу їх кількість на клітинах.

Після 10 років рутинних експериментів з радіоактивно міченим адреналіном у 1980 р. Р. Лефковіц і його команда запропонували найімовірніший механізм дії адреналінових рецепторів — «теорію трійчастого комплексу». За цією теорією, з внутрішнього боку мембрани до адренорецептора, що міститься в мембрані клітини, прилягає G-протеїн, який складається з трьох субодиниць — α , β , γ — і зв'язаний з молекулою гуанозиндифосфату (GDP). У разі зв'язування адреналіну з рецептором в останньому відбуваються складні конформаційні перебудови, що зумовлюють спочатку міцне приєднання G-протеїну, а потім його активацію та відокремлення. Під час активації молекула гуанозиндифосфату (GDP) фосфорилується, утворюючи молекулу гуанозинтрифосфату (GTP), і G-протеїн розпадається на дві частини: α -субодиниця-GTP і β -субодиниця- γ -субодиниця, які активують вторинні посередники і викликають каскади реакцій, що змінюють метаболізм клітини. Потім α -субодиниця гідролізує GTP до GDP, деактивується, об'єднується з β - γ -димером, і цілий G-протеїн знову приєднується до адреналінового рецептора.

Для того щоб з'ясувати, як адреналіновий рецептор зв'язується з лігандом, як саме відбувається активація G-білка, потрібно було одержати рецептор у значній кількості, знайшовши його ген і клонувавши його. Це дуже складне на той час завдання Р. Лефковіц поставив перед Брайаном Кобилкою — молодим співробітником своєї лабораторії. В 1986 р. Б. Кобилка разом з колегами частинами розшифрував амінокислотну послідовність β -адренорецептора, по шматочках зібрав цілий ген, зміг його клонувати і навчився виділяти рецептор у великих кількостях.

Виявилось, що адренорецептор складається із семи трансмембранних α -спіралей і дуже подібний до родопсину, структуру якого було досліджено завдяки роботам кількох лабораторій, зокрема радянських учених під керівництвом академіка Ю.А. Овчиннікова. Це дозволило зробити припущення, що за принципом трійчастого комплексу працюють не лише β -адренорецептор і родопсин, а

й більша частина інших, відомих на той час, рецепторів. Така гіпотеза згодом підтвердилася, і стало зрозуміло, що передавання сигналів за допомогою GPCR є універсальним механізмом «спілкування» клітин з іншими клітинами та навколишнім середовищем. Надзвичайна гнучкість реагування клітин на зміни навколишнього середовища (зв'язування рецептора з лігандом може викликати абсолютно різні реакції) пояснювалася різним субодичним складом G-протеїнів і різним набором вторинних посередників.

Для вивчення механізму роботи GPCR необхідно було добути інформацію про їхню просторову структуру за допомогою рентгеноструктурного аналізу. Однак тривалий час це не вдавалося зробити, незважаючи на наполегливу працю багатьох лабораторій світу, оскільки GPC-рецептори є жиророзчинними і за звичайних умов не піддаються кристалізації.

У 2000 р. Кржиштоф Пальчевський та його співробітник Тетсуї Окада з Університету Кейс Вестерн Резерв (Case Western Reserve University) у Клівленді (США) успішно здійснили рентгеноструктурний аналіз родопсину [1], однак структуру адренергічного рецептора людини Брайану Кобилці та Рею Стівенсу вдалося одержати лише в 2007 р. [2–4]. Вагомий внесок у цю роботу зробив Вадим Черезов із лабораторії Рея Стівенса. Він оптимізував умови для кристалізації рецептора в ліпідній кубічній фазі з використанням холестерину. В 2007–2012 рр. у лабораторіях Б. Кобилки і Р. Стівенса було визначено структури 15 різних GPCR, у тому числі опіоїдних рецепторів, що відкривало можливості для розроблення нових лікарських препаратів: знеболювальних засобів, антидепресантів, ліків для боротьби з наркозалежністю та відчуттям тривоги. Однак мрією Брайана Кобилки було з'ясувати структуру комплексу активованого β -адренорецептора з G-протеїном у момент його активації, щоб мати повне уявлення про механізм дії цього рецептора. І ось у 2011 р., завдяки застосуванню методів молекулярної інженерії та стабілізації протеїну антитілами, Б. Кобилці вдалося кристалізувати сигналь-

ний комплекс між активованим β -адренорецептором і G-протеїном, а також у співпраці з Роджером Сунахара з Мічиганського університету в Анн Арбор визначити структуру комплексу, що дало можливість докладніше розглянути процес передавання сигналу від рецептора до G-протеїну [5].

Таким чином, завдяки багаторічним зусиллям Р. Лефковіца, Б. Кобилки та інших учених, людство дізналося про існування унікального сімейства рецепторів, зв'язаних з G-протеїнами, які контролюють більшість життєво важливих процесів в організмі людини і тварин. Структурні дослідження останніх п'яти років розкрили особливості розпізнавання лігандів цими рецепторами та передавання сигналів до G-протеїнів. Однак, як завжди буває в науці, визначне відкриття, даючи відповідь на одне питання, порушує низку інших. Ученим іще належить з'ясувати, завдяки яким відмінностям у будові цих рецепторів вони здатні розпізнавати різні ліганди, якими є особливості сигнальних каскадів від різних типів лігандів, яке значення має димеризація цих рецепторів тощо. Тому до GPCR нині прикута увага багатьох дослідників у всьому світі.

Лабораторія Брайана Кобилки вивчає фізіологічну роль і механізм дії різних типів адренергічних рецепторів з використанням ліній нокаутних мишей, позбавлених певного рецептора внаслідок штучного видалення відповідного гена, що кодує той чи інший тип рецептора. Одержані дані можуть бути корисними, зокрема для розроблення нових підходів у лікуванні серцевої недостатності в людини. Лабораторія Роберта Лефковіца вивчає механізми зміни функціонування рецепторів під впливом лігандів, з якими вони взаємодіють (гормонів, ліків тощо), тобто природу явища десенсибілізації рецепторів, яке зумовлює стійкість до дії медичних препаратів або зниження їхньої ефективності з часом. Р. Лефковіц зі співробітниками відкрили низку протеїнів, що спричиняють десенсибілізацію рецепторів: по-перше, це кінази рецепторів, зв'язаних з G-протеїнами (GRKs) [6], які фосфорилують активовані рецептори, змінюючи тим самим

їхню структуру; по-друге — арестини, що зв'язують фосфорильовані рецептори, перешкоджаючи їх нормальному функціонуванню [7]. Виявилось, що ці протеїни не лише зумовлюють десенсибілізацію рецепторів (GPCR), а й виконують функції сигнальних протеїнів, запускаючи каскад реакцій під час блокування активації G-протеїну рецептором. Значення цього каскаду ще маловідоме й потребує подальших досліджень.

Розуміння механізму дії арестинів і GRKs може сприяти розробленню нових ліків і нових методів лікування захворювань людини. Сьогодні для терапії серцево-судинних захворювань найчастіше використовують блокатори двох типів GPCR: β -адренергічних та ангіотензинових рецепторів, які запобігають небезпечній гіперстимуляції цих рецепторів і виникненню внаслідок цього гіпертонії, стенокардії або серцевої недостатності. Однак такі блокатори повністю гальмують активність рецепторів, що спричинює небажані побічні ефекти. Натомість запуск каскаду арестинів дає змогу досягти більш гнучкої регуляції їхньої активності.

Відкриття, відзначені цього року Нобелівськими преміями з хімії, а також з фізіології та медицини, можливо, вже в недалекому майбутньому приведуть до появи медицини нового покоління, коли безпечні ліки добиратимуть для кожного конкретного пацієнта після тестувань на клітинних моделях, одержаних з індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (iPSC), та згідно з генетичною інформацією про його GPCR. Результати досліджень нобелівських лауреатів дають надію на те, що багато невиліковних на сьогодні захворювань буде переможено, і, хто знає, можливо, давня мрія людства про вічну молодість і безсмертя виявиться не такою вже й нездійсненою.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Palczewski K., Kumasaka T., Hori T. et al.* Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor // *Science*. — 2000. — V. 289, N 5480. — P. 739–745.
2. *Rasmussen S.G., Choi H.J., Rosenbaum D.M. et al.* Crystal structure of the human β_2 adrenergic G-protein-coupled receptor // *Nature*. — 2007. — V. 450, N 7168. — P. 383–387.
3. *Rosenbaum D.M., Cherezov V., Hanson M.A. et al.* GPCR engineering yields high-resolution structural insights into β_2 -adrenergic receptor function // *Science*. — 2007. — V. 318, N 5854. — P. 1266–1273.
4. *Cherezov V., Rosenbaum D.M., Hanson M.A. et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor // *Science*. — 2007. — V. 318, N 5854. — P. 1258–1265.
5. *Rasmussen S.G.F., DeVree B.T., Zou Y. et al.* Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor — Gs protein complex // *Nature*. — 2011. — V. 477, N 7366. — P. 549–555.
6. *Premont R.T., Koch W.J., Inglese J., Lefkowitz R.J.* Identification, purification, and characterization of GRK₃, a member of the family of G protein-coupled receptor kinases // *J. Biol. Chem.* — 1994. — V. 269, N 9. — P. 6832–6841.
7. *Benovic J.L., Kuhn H., Weyand I. et al.* Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1987. — V. 84, N 24. — P. 8879–8882.

Стаття надійшла 26.11.2012 р.

С.И. Романюк, С.В. Комиссаренко

Институт биохимии им. А.В. Палладина
Национальной академии наук Украины
ул. Леонтовича, 9, Киев, 01601, Украина

ЗАЧЕМ НУЖНЫ РЕЦЕПТОРНЫЕ ПРОТЕИНЫ НА МЕМБРАНАХ КЛЕТОК, ИЛИ КАК РАЗНЫЕ КЛЕТКИ ОРГАНИЗМА ВОСПРИНИМАЮТ ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ?

Лауреатами Нобелевской премии по химии 2012 года стали американские ученые Роберт Лefkowitz и Брайан Кобылка за «исследования рецепторов, связанных с G-протеинами» (GPCR). GPC-рецепторы на поверхности специализированных клеток выполняют роль структур распознавания специфических сигналов из среды, окружающей клетку. Взаимодействуя с разнообразными внеклеточными эффекторами: гормонами, нейромедиаторами, биоактивными пептидами, ионами, лекарствами и т.п., эти рецепторы контролируют большое количество процессов, крайне важных для функционирования организма. GPCR — это семейство подобных по структурной организации и функции рецепторов эукариотических клеток, которые имеют семь трансмембранных доменов и передают внутри клетки сигнал благодаря активации GTP-связанных протеинов (G-протеинов). Последние активируют каскад внутриклеточных сигналов, в результате которого происходит ответ клетки на раздражитель (или определенный физиологический эффект).

Исследования Р. Лефковица и Б. Кобылки стали фундаментальным вкладом в определение пространственной структуры GPC-рецепторов и в изучение механизмов их функционирования.

Ключевые слова: G-протеины, рецепторы GPCR, Нобелевская премия, Лефковиц, Кобылка.

S.I. Romanyuk, S.V. Komisarenko

Palladin Institute of Biochemistry
of National Academy of Sciences of Ukraine
9 Leontovicha St., Kyiv, 01601, Ukraine

RECEPTOR PROTEINS ON CELL MEMBRANE —
WHAT ARE THEY FOR, OR HOW DIFFERENT
CELLS OF THE ORGANISM PERCEIVE
THE ENVIRONMENT?

Nobel Prizes 2012 in Chemistry were awarded to two American scientists — Brian K. Kobilka and Robert J. Lefkowitz for their work on «understanding how

G-protein-coupled receptors (GPCR) function». GPC-receptors on the cell surface play crucial role in specific signals recognition from the cell surrounding environment. Interacting with various extracellular effector molecules, as for example: hormones, neurotransmitters, bioactive peptides, ions, drugs etc, they control extremely large quantity of the most vital processes in the organism. GPCR is a family of eukaryotic cell plasma membrane protein receptors, which share common structure (have seven transmembrane domains) and which transmit a specific signal into the cell, due to the activation of GTP-binding proteins (G-proteins). The latter activate a cascade of intracellular signals resulting in cell response to ligand binding to GPCR (or to the specific physiological effect). B. Kobilka and R. Lefkowitz made fundamental contribution into the research of GPCR function and conformational structure.

Keywords: G-proteins, GPCR, Nobel Prize, Kobilka, Lefkowitz.