

## НОБЕЛІВСЬКІ ПРЕМІЇ ЗА ДОСЛІДЖЕННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ТА РЕЦЕПТОРІВ, ЗВ'ЯЗАНИХ ІЗ G-ПРОТЕЇНАМИ: ЗНАЧЕННЯ ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ

С. І. РОМАНЮК, С. В. КОМІСАРЕНКО

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України

E-mail: svk@biochem.kiev.ua

Нобелівські премії, які є беззаперечним свідченням визнання світовою науковою спільнотою значущості роботи вченого, за традицією вручають кожного року 10 грудня — у день смерті шведського підприємця і винахідника Альфреда Нобеля (1833–1896), засновника Нобелівських премій. І сама церемонія нагородження, і оголошення лауреатів завжди привертають неабияку увагу не тільки науковців, а й широкого загалу. 8 жовтня 2012 р. в Стокгольмі розпочався 111-й Нобелівський тиждень, і традиційно першими було оголошено лауреатів премій з фізіології та медицини — найбільш престижної нагороди в галузі біології, а другими — 10 жовтня — лауреатів з хімії.

За правилами Нобелівського фонду імена провідних світових учених, що претендували на премію, мають бути оприлюднені лише через 50 років. Утім, експерти серед претендентів на нагороду з фізіології та медицини називали Чарльза Девіда Елліса і Майкла Грюнштейна (США), які займаються вивченням гістонів — протеїнів, що відповідають за тривимірну упаковку молекул ДНК у хромосомах; Річарда О. Хайнса і Ерккі Руослахті (США) та Масатоші Такейчі (Японія), які відкрили молекули клітинної адгезії, а також Франца-Ульріха Хартля (Німеччина) і Артура Горвіча (США), які дослідили механізм укладання молекул протеїнів у певну тривимірну структуру, необхідну для їхньої роботи.

Однак, цьогорічними лауреатами Нобелівської премії з фізіології та медицини (200-м і 201-м за рахунком) стали британець Джон Гердон (John Bertrand Gurdon) з Гердонівського інституту (Gurdon Institute) у Кембриджі і японець Шінія Яманака (Shinya Yamanaka), співробітник Інституту серцево-судинних захворювань Гледстоуна в Сан-Франциско (Gladstone Institute of Cardiovascular Disease in San Francisco) і

професор Університету Кіото (Kyoto University). Як сказано в офіційному формулюванні Нобелівського комітету, премію присуджено за «відкриття можливості перепрограмування диференційованих клітин у плюрипотентні». Слід зазначити виняткове значення цих досліджень для розвитку новітніх технологій у галузі біомедицини, фармакології та сільського господарства.



Джон Гердон

Фото: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:John\\_Gurdon\\_Cambridge\\_2012.JPG?uselang=ru](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:John_Gurdon_Cambridge_2012.JPG?uselang=ru)

Джон Гердон народився 2 жовтня 1933 р. у м. Диппенгол (Великобританія). Після навчання в Ітонському коледжі він вступив до Крайст-Черч коледжу Оксфордського університету, де спочатку вивчав антикозnavство, а згодом — зоологію. Після здобуття ступеня доктора наук Гердон продовжив наукову діяльність у Каліфорнійському технологічному інституті. В 1962–1971 рр. працював на кафедрі зоології Оксфордського університету, а в 1971–1983 рр. — в Лабораторії молекулярної біології Кембриджського університету. З 1983 р. до цього часу він є співробітником кафедри зоології Кембриджського університету. У 1989 р. Гердон заснував у Кембриджі Інститут клітинної

біології та онкології і до 2001 р. обіймав посаду його керівника. В 1991–1995 рр. він був членом Наффілдської ради з біоетики, а в 1994–2002 рр. — магістром коледжу Магдалени Кембриджського університету.

Шінія Яманака народився 4 вересня 1962 р. в м. Осака (Японія). В 1987 р. він отримав вищу медичну освіту в Університеті Кобе за спеціальністю ортопедія. В 1993 р. захистив ступінь доктора в галузі фармакології у Вищій школі Університету Осаки. В 1993–1996 рр. Яманака працював в Інституті серцево-судинних захворювань Гледстоуна, Сан-Франциско (США); в 1996–1999 рр. — в Медичній школі Університету Осаки, а в 1999–2005 рр. — в Інституті науки і технологій Нарі (Японія). З 2005 р. Яманака працює в Інституті передових медичних наук в Університеті Кіото.



Шінія Яманака

Фото: <http://stv.mediasapiens.ua/material/11097>  
(Японія)

На цей час Шінія Яманака є директором Центру дослідження і застосування іPS-клітин Університету Кіото та провідним дослідником Інституту серцево-судинних захворювань Гледстоуна, Сан-Франциско.

У 2009 р. Джон Гердон і Шінія Яманака удостоїлися почесної премії Альберта Ласкера (її називають «другою американською Нобелівською премією з медицини») в номінації Basic. Престижну ізраїльську премію Вольфа з медицини Гердон отримав у 1989 р., а Яманака — в 2011. Крім безлічі інших премій, отриманих обома вченими, Яманака також є лауреатом престижної «технологічної» премії Millennium. У 1995 р. Джон Бертран Гердон отримав титул лицаря-бакалавра, а в 2004 р. Кембриджський інститут клітинної біології та раку при благодійних фондах Wellcome Trust і Cancer Research, UK, було перейменовано в Гердонівський інститут.

Що ж за прорив у науці було зроблено цими вченими, які належать до різних поколінь, і що означає «перепрограмування диференційованих клітин у плюрипотентні»?

Кожен організм складається з великої кількості соматичних (не статевих) клітин, які можуть істотно відрізнитися за морфологією та функціями, наприклад, клітини нервової та імунної систем, печінки, м'язів, кісток, крові, нирок, волосся та інших тканин чи органів, — усі ці клітини різні, але вони містять абсолютно однакову генетичну інформацію (мають однакову послідовність основ у ДНК). Як це може бути? Виявляється, що відмінності між соматичними клітинами різних типів зумовлені тим, що в різних типах клітин експресуються різні гени. Яким же чином виникають ці відмінності в експресії генів?

Під час ембріонального розвитку з кожним поділом зиготи — єдиної клітини, з якої розвивається багатоклітинний організм, ці відмінності стають дедалі помітнішими. Причиною їх виникнення є те, що клітини зародка опиняються в різних умовах: щільність різних речовин у різних ділянках зиготи відрізняється, на клітини в різних ділянках зародка по-різному впливають певні фізичні параметри, з часом самі клітини починають впливати одна на одну, виділяючи ті чи інші біологічно активні речовини. Поступово клітини утворюють три шари — зовнішній (ектодерму), серединний (мезодерму) і внутрішній (ентодерму). Згодом клітини і в цих трьох шарах починають істотніше відрізнитися одна від одної і врешті-решт утворюють усі органи й тканини організму. Таким чином, абсолютно недиференційована зигота дає початок термінально диференційованим (тобто абсолютно спеціалізованим) клітинам, які вже не можуть ділитися і з часом старіють і помирають.

Джерелом нових диференційованих клітин є так звані «стовбурові клітини» — незрілі клітини, здатні до самовідновлення і розвитку в спеціалізовані клітини організму. Цей термін запропонував у 1909 р. видатний російський учений Олександр Максимов, який передбачив існування таких клітин крові, які здатні дати початок декільком іншим типам клітин. У 1960-х рр. канадці Джеймс Тілл і Ернст МакКаллох уперше виявили стовбурові клітини, досліджуючи процес гемопоезу. В 1981 р. американський біолог Мартін Еванс уперше виділив недиференційовані плюрипотентні стовбурові клітини із зародка миші, за що в 2007 р. отримав Нобелівську премію. У 1998 р. американцям Джону Герхарту і Джеймсу Томпсону вдалося одержати і розмножити культури ембріональних стовбурових клітин, здатних розвиватися в різні зрілі кліти-

ни і органи. (Між іншим, перша в СРСР наукова конференція, присвячена стовбуровим клітинам, відбулась у Києві в 1976 році на базі Інституту проблем онкології АН УРСР за ініціативи академіків АН УРСР Р. Є. Кавецького та З. А. Бутенка, а одні з перших публікацій у світі з морфології стовбурової клітини теж належали українським ученим [1, 2].

Залежно від джерела отримання стовбурові клітини можна розділити на три групи: ембріональні, які одержують із внутрішньоклітинної маси бластоцисти на ранній стадії розвитку зародка; фетальні — із плодового матеріалу після абортів та постнатальні, що є стовбуровими клітинами дорослого організму. Використання ембріонів для одержання ембріональних і фетальних стовбурових клітин пов'язано з етичними проблемами, а постнатальні стовбурові клітини мають меншу потентність, хоча етичний аспект їх використання не викликає серйозної полеміки.

Найбільше стовбурових клітин у новонароджених немовлят; з віком кількість цих клітин поступово зменшується, однак вони продовжують функціонувати навіть у глибокій старості. Депо стовбурових клітин існує для кожної тканини, кількість стовбурових клітин пропорційна швидкості оновлення клітин цієї тканини, тобто стовбурових клітин шкіри набагато більше, ніж стовбурових клітин нервової системи.

Найбільш універсальні стовбурові клітини, наприклад зигота та бластомери — клітини, що утворилися за декількох перших поділів зиготи, можуть дати початок цілому організмові. Такі клітини називаються тотипотентними стовбуровими клітинами. Менш універсальними є плюрипотентні стовбурові клітини, що утворюються під час декількох наступних зародкових поділів (до поділу на зародкові листки) і можуть дати початок усім клітинам організму, але не плаценті. Спеціалізовані мультипотентні стовбурові клітини можуть дати початок клітинам різних типів, але не всім. Поступове диференціювання нащадків мультипотентних клітин призводить до появи олігопотентних (дають початок тільки невеликій кількості типів клітин) і уніпотентних (дають початок тільки одному типу) клітин. Отже, в кожному організмі під час розвитку відбувається процес поступового диференціювання клітин і втрати їхньої поліпотентності, та, як вважали раніше, шляху назад немає.

Однак Джон Гердон і Шінія Яманакі завдяки своїй наполегливій праці довели, що це не так, за що вони, власне, і отримали

Нобелівську премію. На сьогодні загальновідомими є перспективи використання стовбурових клітин у сучасній біомедицині. Технології створення штучних органів і систем організму, заміна хворих органів і тканин вироценими зі стовбурових клітин, на основі чого стає можливою боротьба з найбільш небезпечними на сьогодні захворюваннями: серцево-судинними, онкологічними, опорно-рухового апарату та іншими — це тільки найголовніші аспекти використання цього біотехнологічного напрямку в сучасній медицині. У цьому зв'язку можна згадати також успіхи, досягнуті завдяки дослідям із клонування, що стали можливими в результаті описаних досліджень.

Експерименти в галузі клонування робив ще в 1914 р. німецький учений Ганс Шпеман, який уперше пересадив ядро з однієї клітини в іншу. У 1940-х рр. російський ембріолог Георгій Лопашов розробив метод пересадження клітинних ядер в яйцеклітину жаби, однак у числі інших радянських дослідників він зазнав переслідувань і не зміг завершити цю роботу. Джон Гердон удосконалив методику Лопашова і продовжив дослідження трансплантації ядер у клітинах бластул, проведені Бріггсом і Кінгом в 1952 р. Робота, що її виконав Джон Гердон в Оксфордському університеті в 1958 р. (опублікована 1962 р.), давно вже стала класичною і наводиться в будь-якому серйозному підручнику з ембріології [3]. Метою експерименту Гердона було з'ясувати, чи несе ядро диференційованої клітини достатньо інформації, щоб дати початок новому організмові. Для цього він зруйнував опроміненням ядро яйцеклітини шпорцевої жаби (*Xenopus laevis*) та пересадив у таку без'ядерну клітину ядро диференційованої клітини (клітини епітелію кишечника пуголовка). Подібні експерименти проводили раніше інші дослідники, однак саме Гердону вдалося одержати з такої «химерної» яйцеклітини здорового пуголовка. Більше того, у двох відсотках випадків пуголовки перетворювались на дорослих жаб.

Цей експеримент довів, що геном соматичної клітини містить усю інформацію, яка є в яйцеклітині, а отже диференціювання клітин не пов'язане з деградацією частини генів. Результати роботи Гердона спочатку були сприйняті зі скептицизмом, але після підтвердження вони докорінно змінили тогочасні уявлення про диференціювання клітин: виявилось, що диференційована клітина може відновити плюрипотентність, тобто процес диференціювання може бути

обернений. Відкриття Гердона дало початок подальшим численним дослідженням, зокрема роботам з клонування тварин. До речі, термін «клон» уперше було використано стосовно тварин британським ученим Джоном Холдейном у 1963 р. за описання результатів Гердона. Подальші роботи Гердона були присвячені дослідженню міжклітинних сигнальних чинників, задіяних у диференціюванні клітин, а також механізмів відновлення плюрипотентності в експериментах з трансплантації ядер, зокрема ролі метилювання ДНК у цьому процесі.

Цікавим збігом є те, що в 1962 р., коли Гердон опублікував свою «нобелівську» статтю, народився Шінія Яманака, який через 40 років зробив наступний революційний крок у дослідженнях, розпочатих Гердоном.

Експерименти Гердона з клонування жаб і народження в 1996 р. першого ссавця, клонованого зі зрілої соматичної клітини, — вівці Доллі [4] довели, що соматичні клітини можуть перетворитись на ембріональні стовбурові клітини у разі перенесення генетичного матеріалу соматичної клітини в незапліднене яйце, що якимось загадковим чином приводить хромосоми у вихідний стан, в якому вони були в щойно заплідненій яйцеклітині. Однак залишалося невідомим, які чинники в яйці зумовлюють цей процес, і чи можливо перепрограмувати диференційовані соматичні клітини в плюрипотентні без використання яйця.

У 2006 р. Яманаці вдалося перетворити клітину шкіри (диференційований мишачий фібробласт) на плюрипотентну стовбурову клітину без пересадження ядра [5]. Одержані ним клітини назвали індукованими плюрипотентними стовбуровими клітинами (iPSC). Яким же чином вдалося це здійснити?

Із часів експериментів Гердона було розроблено методи генної інженерії, що дали змогу вставляти в клітину ген, який успішно в ній експресувався, і таким чином відбувався синтез протеїну, кодованого цим геном, що стало основою для багатьох сучасних біотехнологій. Одним зі способів доставлення гена в клітину є використання вірусів (наприклад, ретровірусів), у яких частина генетичного матеріалу замінена на гени необхідних протеїнів. Після зараження клітини цим вірусом відбувається вбудовування вірусної ДНК в геном клітини та синтез відповідних протеїнів, які, у свою чергу, можуть впливати на фізіологічні процеси в клітині та на експресію інших генів. Завдяки розробленню таких методик стали можливими експерименти з одержання iPSC.

Яманака займався вивченням механізмів підтримання плюрипотентності в ембріональних стовбурових клітинах (ЕСК) миші. Він виявив понад 1000 генів, що характеризувалися підвищеною активністю в ЕСК, і для дослідження їхньої ролі вирішив вставити їх у різних комбінаціях в диференційовані клітини. Звичайно, перевірити всі комбінації було неможливо, тим більше, що спрацювати могла будь-яка комбінація із цих генів. Тому пошук обмежили декількома десятками генів — найбільш імовірних теоретично. І ось після тривалих експериментів Яманаці вдалося показати, що для перепрограмування диференційованої клітини в плюрипотентну стовбурову досить підвищення експресії всього чотирьох генів: Oct3/4, Sox2, Klf4 і c-Myc. Окрім того, було показано, що одержані плюрипотентні стовбурові клітини можна змусити знову диференціюватись у клітини різних тканин. У 2007 р. Яманака одержав повністю епігенетично перепрограмовані iPS-клітини миші, з яких вдалося отримати дорослих мишей [6]. Інші дослідники в 2009 р. одержали тетраплоїдні iPS-клітини, що за своїми властивостями більше нагадували ЕСК і теж були здатні розвинути у дорослих мишей [7].

Після того як Яманака одержав позитивні результати в експериментах з клітинами мишей, він випробував ту саму методику для отримання iPSC із клітин шкіри людини. Паралельно з групою Яманаки над цією проблемою працювала група Джеймса Томсона з Вісконсину (Медісон, США). Лабораторії Яманаки і Томсона були першими, хто одержав iPS-клітини людини [8, 9]. Для отримання цих клітин Яманака застосував комбінацію з 4 генів, яку він раніше використовував для одержання iPS-клітин миші (Myc, Oct4, Sox2 та Klf4), тимчасом як Томсон скористався дещо іншою комбінацією генів (Lin28, Nanog, Oct 4 та Sox2). Певний внесок у виконання цієї роботи зробив український вчений, який працював у лабораторії Томсона, — Максим Водяник, розпочавши свої дослідження, що стосувалися моноклональних антитіл проти фактора некрозу пухлин людини, в Інституті педіатрії, акушерства та гінекології НАМН України.

Відкриття Гердона та Яманаки було справжнім проривом у розумінні механізму диференціювання клітин, і, як було зазначено вище, воно дало дослідникам фантастичні можливості та відкрило значні перспективи використання iPS-клітин у багатьох галузях біомедицини. Звичайно, перше, що спадає на думку, — можливість використо-

увати iPSC для відновлення органів і тканин — або старих, або ушкоджених. Якщо буде розроблено методику штучного «вирощування» певних тканин людського тіла, відбудеться революція в трансплантології, адже клітини, одержані з iPSC, є генетично ідентичними клітинам цього організму і не здатні спричинити імунне відторгнення трансплантатів. Такі клітини можуть бути застосовані для боротьби з дегенеративними захворюваннями, наприклад із хворобою Паркінсона та діабетом типу I, для підвищення ефективності операцій на серці та операцій з видалення пухлин (наприклад, підшлункової залози чи печінки) і, звичайно, для лікування опіків, коли успішна трансплантація шкіри є єдиним шансом на порятунок. Крім того, раніше робота зі стовбуровими клітинами людини порушила етичні проблеми та була в багатьох країнах або заборонена, або пов'язана з серйозними юридичними труднощами, оскільки єдиним джерелом цих клітин були людські ембріони, яких знищували для виділення ЕСК. Яманака відкрив спосіб одержання плюрипотентних стовбурових клітин у необмеженій кількості, знявши таким чином ці обмеження. Однак, поки що рано говорити про припинення використання ЕСК, оскільки існує багато перешкод, які слід подолати на шляху до повного розуміння явища плюрипотентності та одержання iPSC-клітин, придатних для лікування людей.

Річ у тім, що процедури, які використовують для перепрограмування клітин, можуть спричинювати мутації або інші геномні порушення, що робить їх непридатними для клітинної терапії. У процесі одержання iPSC-клітин з метою введення генів у геном клітин використовують ретровіруси, які вставляють ці гени навмання, іноді викликаючи мутації, що перетворюють нормальні клітини на злоякісні. Один із генів, що його використав Яманака (с-Myc), насправді є геном раку. В експериментах Яманаки 20% мишей, що розвинулися з iPSC-клітин, захворіли на рак.

З огляду на це протягом останніх років було розпочато дослідження, які уможливають в майбутньому використання клітин, одержаних з iPSC, зробивши їх безпечними для лікування пацієнтів. 2008 р. в лабораторії Яманаки було одержано iPSC-клітини без використання вірусних векторів, що інтегруються в ДНК [10]. Зараз триває робота з розроблення нових методик одержання iPSC-клітин, що використовують не ретровіруси, а хімічні речовини або більш безпечні віруси.

На сьогодні клітини, одержані з iPSC, не підходять для заміни ушкоджених клітин або тканин у пацієнтів, але такі клітини є ідеальними як модельна система для вивчення причин виникнення захворювань, розроблення методів їх лікування та створення нових лікарських препаратів. Наприклад, дослідники можуть зробити iPSC із клітин людини з хворобою Альцгеймера і перетворити їх на нейрони в чашці Петрі (такий підхід ще називають «захворювання в чашці Петрі»). Це дає змогу досліджувати патогенез і розробляти методи профілактики та лікування цього захворювання. iPSC можуть також бути використані для токсикологічного тестування та підвищення ефективності ліків. Крім того, можна проводити скринінг лікарських препаратів та обирати найбільш ефективне й економічно обґрунтоване лікування для кожного конкретного пацієнта.

Виняткове значення цих експериментів для біотехнології полягає в тому, що на сьогодні вже створено клітинні моделі різних захворювань: аміотрофічного латерального склерозу (ALS), спинальної м'язової атрофії (SMA), сімейної гіперхолестеринемії, деяких серцево-судинних захворювань (наприклад, синдрому Тімоті) [11]. Використання моделей, що базуються на iPSC-клітинах, дозволяє з'ясувати природу захворювання на молекулярному рівні. Наприклад, дослідження сімейної дисаутономії на такій моделі допомогло відкрити новий фактор — кінетин, що відіграє важливу роль у виникненні цього захворювання [12]. Дослідження останніх років спрямовано на вивчення механізму перепрограмування соматичних клітин в iPSC. Показано, що під час такого перепрограмування відбувається стирання соматичних епігенетичних сигналів, які представлені метилюванням ДНК або модифікацією пістонів, у локусі плюрипотентності і створення альтернативних епігенетичних міток ембріональних стовбурових клітин. Так, з'ясовано, що для одержання iPSC два фактори — *Pap1* і *Tet2* — мають реалізувати такі епігенетичні модифікації в локусах *Nanog* та *Esrrb* [13].

Звичайно, розроблення ефективних і безпечних методик перетворення соматичних клітин на плюрипотентні потребує значних зусиль і подальших тривалих досліджень, але роботи останніх років дають надію, що досягнення успіху в цьому напрямі є можливим і, навіть, досить швидким.

У наш час найбільш цікаві та перспективні наукові роботи виконуються, як правило, на стику, або, правильніше, «на перехрестях» традиційних дисциплін, однак

Нобелівські премії досі присуджуються в чітко розмежованих галузях медицини або фізіології, фізики та хімії. Намагаючись утримуватись у цих жорстких рамках, Нобелівський комітет дедалі частіше присуджує премію з хімії за досягнення в галузі біохімії, що мають безпосереднє відношення до фізіології та медицини. Так, 10 жовтня 2012 р. було оголошено, що цьогорічну Нобелівську премію з хімії отримали два американських професори — Роберт Лефковіц з Університету Дьюка в Північній Кароліні і Брайан Кобилка зі Стенфордського університету в Каліфорнії — за дослідження рецепторів, пов'язаних із G-протеїнами (GPCR — G-protein-coupled receptors). Обидва вчених мають медичну освіту, а за відкриття та вивчення саме G-протеїнів у 1994 р. Альфреду Гілману та Мартіну Родбелло було присуджено Нобелівську премію з фізіології та медицини.

Дослідження рецепторів, пов'язаних із G-протеїнами (GPGR), мають першочергове значення для створення сучасних біотехнологій, які можуть бути використані, передусім, у фармакології для створення новітніх ефективних ліків цілеспрямованої дії та на їх основі методів лікування найбільш небезпечних захворювань. Створення таких ліків дасть змогу проводити лікування строго індивідуально, виходячи з генетичних особливостей кожного пацієнта, що є вагомим внеском у розвиток фармакогенетики.

Роберт Лефковіц (Robert Lefkowitz) народився 1943 р. у Нью-Йорку в родині єврейських емігрантів з Польщі. У 1962 р. він отримав ступінь бакалавра мистецтв у Колумбійському коледжі при Колумбійському університеті Нью-Йорка, а 1966 р. у Коледжі загальної терапії та хірургії при тому самому університеті — ступінь доктора медицини (MD). З 1968 до 1970 р. працював у системі Національних інститутів здоров'я



**Роберт Лефковіц**

Фото: <http://www.efeverde.com/contenidos/mediateca/fototeca/10-octubre-2012-13-57-00-robert-lefkowitz-premio-nobel-de-quimica-2012-cientifico>

та в Головному госпіталі Массачусетсу в Бостоні (MGH), у 1973–1976 рр. — в Американській кардіологічній асоціації (American Heart Association). З 1973 р. працює в Університеті Дьюка, а з 1976 р. — у Медичному інституті Говарда Х'юза. У 2007 р. удостоєний Національної медалі науки (National Medal of Science), що її вручають за указом Президента США, та отримав азіяський аналог Нобелівської премії — премію Шоу (Shaw Prize).

Брайан Кобилка (Brian Kobilka) народився 1955 р. у штаті Міннесота в родині з німецько-польським корінням. Отримав ступінь бакалавра з біології та хімії в Міннесотському університеті, згодом здобув ступінь доктора медицини (MD) на медичному факультеті Єльського університету. Після інтернатури у Вашингтонському університеті Кобилка почав працювати в лабораторії Лефковіца. У 1987–2003 рр. працював у Медичному інституті Говарда Х'юза. На цей час лабораторія Кобилки розташована в Стенфордському університеті. У 2007 р. журнал *Science* назвав його дослідження структури GPCR одним із проривів року.

GPCR — це ціла родина схожих за структурною організацією та за функцією рецепторів мембран еукаріотичних клітин, які мають сім трансмембранних доменів і передають всередину відповідної клітини сигнал завдяки активації GTP-зв'язувальних протеїнів (G-протеїнів), що запускають каскад внутрішньоклітинних реакцій, наслідком яких є відповідь клітини на певний подразник (чи певний фізіологічний ефект). GPCR називають ще серпентиновими рецепторами, оскільки на схемі перетинання плазматичної мембрани клітини GPCR протеїнами розташування доменів GPCR має «змієподібний» характер. У геномі людини знайдено близько 800 генів, що кодують різні GPCR. Функцію 150 з них ще остаточно не



**Брайан Кобилка**

Фото: <http://www.aspet.org/ASPET-congratulates-2012-nobel-prize-winners-lefkowitz-and-kobilka/>

з'ясовано, решта — «розпізнають», тобто специфічно взаємодіють з різноманітними лігандами: гормонами, нейромедіаторами, біологічно активними пептидами, іонами тощо. Зокрема, ці рецептори реагують на такі біологічно активні речовини, як хемокіни, гістамін, серотонін, адреналін, дофамін, опіоїди, канабіноїди, кофеїн і багато інших. Тобто GPCR на поверхні спеціалізованих клітин відіграють роль структур розпізнавання специфічних сигналів із середовища, що оточує клітину. Велику кількість найважливіших для функціонування організму процесів контролюють GPCR, зокрема регулювання кров'яного тиску та серцебиття, реагування на небезпеку, відчуття болю або ейфорії, сприйняття зорових образів або запахів, ембріональний розвиток, навчання та пам'ять тощо. Порушення функціонування GPCR спостерігаються при багатьох тяжких захворюваннях, наприклад, за діабету, сліпоти, алергії, депресії, серцево-судинних дефектах і деяких формах злоякісного росту. На фармацевтичному ринку від третини до половини кількості усіх ліків становлять препарати, дія яких спрямована на

GPCR. Так, у 2000 р. обсяг продажу лікарських препаратів, що діють на GPCR (таблиця), становив близько 30 млрд. дол. США [14].

Тому дослідження структури цих рецепторів (GPCR) і механізмів передачі ними сигналів у клітинах-мішенях є важливими для більш глибокого розуміння причин багатьох захворювань та створення ефективних ліків з мінімальними побічними ефектами.

Вивчення GPCR розпочалося ще в XIX ст., коли німецький вчений Вільгельм Кюне в 1870 р. виявив і виділив рецептор, що реагує на світло, — родопсин. Вивчення в подальшому механізму регулювання скорочення м'язових клітин під впливом певних речовин на початку 70-х років XX ст. дало підставу зробити висновок, що існує певна рецепторна субстанція, яка реагує на позаклітинні молекули і передає сигнали всередину клітини.

Метою роботи Роберта Лейфковіца і став пошук цієї рецепторної субстанції, для чого він використав радіоактивно мічений адреналін. На той час про клітинні рецептори було відомо вже досить багато. У 1960-х рр.

Щорічний продаж у світі ліків, що діють на GPCR (2000 р.) [14]

Торгова марка	Назва	Виробник	Хвороба, симптом	Мішень	Млн. дол. США
Claritin	Loratadine	Schering-Plough	Алергії	H1 antagonist	3 011
Zyprexa	Olanzapine	Eli Lilly	Шизофренія	Mixed D2/D1/5-HT2	2 350
Cozaar	Losartan	Merck & Co	Гіпертонія	AT1 antagonist	1 715
Risperdal	Risperidone	Johnson & Johnson	Психози	Mixed D2/5-HT2A	1 603
Leuplin/Lupron	Leuprolide	Takeda	Рак	LH-RH agonist	1 394
Neurontin	Gabapentin	Pfizer	Нейрогенний біль	GABA B agonist	1 334
Allegra/Telfast	Fexofenadine	Aventis	Алергії	H1 antagonist	1 070
Imigran/Imitex	Sumatriptan	GlaxoSmithKline	Мігрень	5-HT1 agonist	1 068
Serevent	Salmeterol	GlaxoSmithKline	Астма	2 agonist	942
Plavix	Clapidogrel	Bristol-Myers Squibb	Інсульт	P2Y12 antagonist	903
Zantac	Ranitidine	GlaxoSmithKline	Виразка	H2 antagonist	871
Singulair	Montelukast	Merck & Co	Астма	LTD4 antagonist	860
Pepcidine	Famotidine	Merck & Co	Виразка	H2 antagonist	850
Cardura	Doxazosin	Pfizer	Гіпертонія	1 antagonist	795
Gaster	Famotidine	Vamanouchi	Виразка	H2 antagonist	763
Zofran	Ondansetron	GlaxoSmithKline	Нудота	5-HT3 antagonist	744
Zoladex	Goserelin	AstraZeneca	Рак	LH-RH agonist	734
Diovan	Valsartan	Novartis	Гіпертонія	AT1 antagonist	727
BuSpar	Buspirone	Bristol-Myers	Депресія	5-HT1 agonist	709
Zyrtec/Reactine	Cetirizine	Pfizer	Алергії	H1 antagonist	699
Duragesic	Fentanyl	Johnson & Johnson	Біль	Opioid agonist	656
Atrovent	Ipratropium	Boehringer Ingelheim	Астма	Anticholinergic	598
Seloken	Metoprolol	AstraZeneca	Гіпертонія	1 antagonist	577

було виявлено, що дія адреналіну на клітини опосередковується особливим типом протеїнів — G-протеїнами, здатними гідролізувати гуанозинтрифосфат — GTP, які викликають у клітині певні каскади реакцій. Однак, як саме це відбувається, було невідомо. На початку 70-х років кілька рецепторів GPCR було ідентифіковано, проте виділити і дослідити їхню структуру (за винятком родопсину) було неможливо через вкрай малу їх кількість на клітинах.

Після 10 років рутинних експериментів з радіоактивно міченим адреналіном Лефковіц та його команда 1980 р. запропонували найбільш імовірний механізм дії адреналінових рецепторів — «теорію трійчастого комплексу». Згідно з цією теорією з внутрішньої сторони мембрани до адренорецептора, що міститься в мембрані клітини, прилягає G-протеїн, який складається з трьох субодиниць —  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  — і зв'язаний з молекулою гуанозиндифосфату (GDP). За зв'язування адреналіну з рецептором відбуваються складні конформаційні перебудови рецептора, що спричинюють спочатку щільне приєднання G-протеїну, а потім його активацію та відділення. Під час активації молекула GDP фосфорилується до молекули GTP, і G-протеїн розпадається на дві частини:  $\alpha$ -субодиниця-GTP та  $\beta\gamma$ -субодиниця, що активують вторинні посередники та викликають каскади реакцій, які змінюють метаболізм клітини. Потім  $\alpha$ -субодиниця гідролізує GTP до GDP; деактивується, об'єднується з  $\beta\gamma$ -димером, і цілий G-протеїн знову приєднується до адреналінового рецептора.

Аби зв'язувати, як адреналіновий рецептор зв'язується з лігандом, яким чином відбувається активація G-протеїну, потрібно було одержати рецептор у великій кількості, знайшовши його ген і клонувавши його. Це вкрай складне на той час завдання Лефковіц поставив перед Брайаном Кобилкою — молодим співробітником з його лабораторії. В 1986 р. Кобилка разом з іншими співробітниками лабораторії розшифрував частини амінокислотну послідовність  $\beta$ -адренорецептора, зібрав за частинками цілий ген, зміг його клонувати і навчився виділяти рецептор у великих кількостях. Виявилось, що адренорецептор складається із семи трансмембранних  $\alpha$ -спіралей і дуже подібний до родопсину, структуру якого було досліджено завдяки роботам декількох лабораторій, зокрема радянських учених під керівництвом академіка Ю. А. Овчиннікова. Це дало підставу зробити припущення, що за при-

нципом трійчастого комплексу працюють не тільки  $\beta$ -адренорецептор і родопсин, але й більша частина інших відомих на той час рецепторів. Це припущення пізніше підтвердилось, і стало зрозуміло, що передача сигналів за допомогою GPCR є універсальним механізмом спілкування клітин з іншими клітинами та навколишнім середовищем. Надзвичайна гнучкість реакції клітин на його зміни (зв'язування рецептора з лігандом може викликати абсолютно різні реакції) пояснювалася різним субодиничним складом G-протеїнів та різним набором вторинних посередників. Хоча GPCR мають схожу мембранну топологію, вони суттєво розрізняються за первинною структурою і особливо за структурою та розміром аміно- і карбоксикінцевих «хвостів». На основі таких структурних різниць серед GPCR виділяють три головні родини рецепторів: родина А (родопсинподібні або адренергічнорецепторподібні), родина В (глюкагонрецепторподібні або секретинрецепторподібні) та родина С (метаботропні глутаматні рецептори). Усередині кожної родини є консервативні ділянки амінокислотних послідовностей (так звані відбитки — «fingerprint») або конформаційних особливостей, що притаманні рецепторами саме такої родини. Так, рецептори родини А, що є найчисленнішою, мають короткі амінокінцеві хвости та дуже консервативні амінокислоти у кожному трансмембранному завитку. Рецептори родини В мають довші амінокінцеві хвости з шістьма цистеїновими залишками, а родини С — ще довші амінокінцеві хвости (завдовжки 500–600 амінокислотних залишків), які структуровані в окремий домен, що зв'язує відповідні ліганди [14].

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

2000 р. Кржиштоф Пальчевський та його співробітник Тетсуї Окада з Університету Кейс Вестерн Резерв (Case Western Reserve University) в Клівленді (США) успішно здійснили рентгеноструктурний аналіз родопсину [15], але Брайану Кобилці та Рею Стівенсу вдалося вперше одержати повні дані щодо структури адренергічного рецептора людини лише в 2007 р. [16–18]. Вагомий внесок у цю роботу зробив Вадим



Черезов з лабораторії Рея Стівенса, який оптимізував умови для кристалізації рецептора в ліпідній кубічній фазі з використанням холестеролу. В 2007–2012 рр. лабораторіями Кобилки і Стівенса було визначено структуру 15 різних GPCR, у тому числі опіоїдних рецепторів, що відкривало можливість для розроблення нових лікарських препаратів: знеболювальних засобів, антидепресантів, ліків для боротьби з наркозалежністю та з відчуттям тривоги. Однак мрією Браїана Кобилки було одержати структуру комплексу активованого  $\beta$ -адренорецептора з G-протеїном у момент його активації, аби мати повне уявлення про механізм дії цього рецептора. І ось 2011 р. завдяки застосуванню методів молекулярної інженерії та стабілізації протеїну антитілами Кобилці вдалося кристалізувати сигнальний комплекс між активованим  $\beta$ -адренорецептором і G-протеїном, а також у співпраці з Роджером Сунахара з Мічиганського університету в Анн Арбор визначити структуру комплексу, що дало можливість більш докладно розглянути процес передачі сигналу від рецептора до G-протеїну [19].

Таким чином, завдяки багаторічним зусиллям Лефковіца, Кобилки та інших учених людство дізналося про існування унікального сімейства рецепторів, пов'язаних із G-протеїнами, які контролюють більшість життєво важливих процесів в організмі людини і тварин. Структурні дослідження останніх п'яти років висвітлили особливості розпізнавання лігандів цими рецепторами та передачі сигналів до G-протеїнів. Однак, як це завжди буває в науці, визначне відкриття, даючи відповідь на одне питання, ставить низку інших. Ученим ще належить з'ясувати, які відмінності в будові цих рецепторів дозволяють їм розпізнавати різні ліганди, якими є особливості сигнальних каскадів від різних типів лігандів, яке значення має димеризація цих рецепторів тощо. Тому до рецепторів GPCR зараз прикута увага багатьох дослідників у всьому світі, і останнім часом, завдяки цій увазі та використанню нових методів вивчення просторової структури протеїнів, з'явилася низка робіт, присвячених структурі рецепторів, зокрема: ноцицептинових [20],  $\beta$ -[21],  $\kappa$ -[22] та  $\mu$ -[23] опіоїдних GPCR.

Лабораторія Браїана Кобилки вивчає фізіологічну роль та механізм дії різних типів адренергічних рецепторів з використанням ліній нокаутних мишей, у яких штучно видалено ген, що кодує той чи інший тип рецептора, і тому відсутній відпо-

відний рецептор. Одержані дані можуть бути корисними для розроблення нових підходів до лікування серцевої недостатності у людей. Лабораторія Роберта Лефковіца вивчає механізми зміни функціонування рецепторів під впливом лігандів, з якими вони взаємодіють (гормонів, ліків тощо), тобто природу явища десенсibiliзації рецепторів, яке зумовлює стійкість до дії ліків або зниження їх ефективності з часом. Лефковіц зі співробітниками відкрили низку протеїнів, які викликають десенсibiliзацію рецепторів: по-перше, це кінази рецепторів, пов'язаних з G-протеїнами (GRKs) [24], які фосфорилують активовані рецептори, змінюючи тим самим їхню структуру; по-друге — арестини, що зв'язують фосфорильовані рецептори, перешкоджаючи їх нормальному функціонуванню [25]. Виявилось, що ці протеїни не тільки спричинюють десенсibiliзацію рецепторів (GPCR), але й виконують функції сигнальних протеїнів, запускаючи каскад реакцій під час блокування активації G-протеїну рецептором. Значення цього каскаду невідоме та потребує подальших досліджень.

Результати цих досліджень є важливими для розвитку сучасної біомедичної науки, оскільки розуміння механізму дії арестинів і GRKs може сприяти розробленню нових ліків і методів лікування захворювань людини. Зараз для лікування серцево-судинних захворювань найчастіше використовують блокатори двох типів GPCR:  $\beta$ -адренергічних та ангіотензинових рецепторів, які запобігають небезпечній гіперстимуляції цих рецепторів та виникненню внаслідок цього гіпертонії, стенокардії або серцевої недостатності. Однак, такі блокатори повністю гальмують активність рецепторів, що викликає небажані побічні ефекти. Натомість запуск каскаду арестинів дозволяє досягти більш гнучкої регуляції їх активності.

Таким чином, відкриття, відзначені цього року Нобелівськими преміями з фізіології та медицини, а також з хімії мають у край важливе значення для розвитку сучасних біотехнологій, зокрема нових перспективних галузей біомедицини. Можливо, вже в недалекому майбутньому вони приведуть до появи медицини нового покоління, коли стануть безперешкодними трансплантації будь-яких тканин, а ефективні й безпечні ліки підбиратимуть для кожного конкретного пацієнта після тестувань на клітинних моделях, одержаних з iPSC, та згідно з генетичною інформацією про його GPCR.

Результати робіт Нобелівських лауреатів знову показують значення фундаментальних

досліджень у галузі наук про життя для розвитку сучасних біотехнологій. Вони дають підстави сподіватися, що багато невиліковних на сьогодні захворювань буде подолано,

і, можливо, давня мрія людства про вічну молодість та безсмертя виявиться не такою вже й нездійсненною.

### ЛІТЕРАТУРА

1. *Butenko Z. A., Komissarenko S. V., Gruzov M. A., Khomenko B. M.* Immunoelectronmicroscopy of the bone marrow mononuclears labeling with rabbit anti-mouse brain serum using peroxidase-anti-peroxidase method // *Blut.* — 1983. — 47, N 6. — P. 343–349.
2. *Зак К. П., Бутенко З. А., Комиссаренко С. В., Хоменко Б. М. и др.* Ультроструктура мононуклеаров костного мозгу, маркованих антистволовоклеточною сывороткою с помощью PАР-метода // *Гематол. трансфузиол.* — 1983. — Т. XXVIII, № 2. — С. 38–42.
3. *Gurdon J. B.* The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles // *J. Embryol. Experim. Morphol.* — 1962. — № 10. — P. 622–640.
4. *Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J. et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // *Nature.* — 1997. — V. 385, N 6619. — P. 810–813.
5. *Takahashi K., Yamanaka S.* Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell.* — 2006. — N 126. — P. 663–676.
6. *Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S.* Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells // *Nature.* — 2007. — V. 448, N 7151. — P. 313–317.
7. *Zhao X. Y., Li W., Lv Z. et al.* iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation // *Ibid.* — 2009. — V. 461, N 7260. — P. 86–90.
8. *Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell.* — 2007. — V. 131, N 5. — P. 861–872.
9. *Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K. et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells // *Science.* — 2007. — V. 318, N 5858. — P. 1917–1920.
10. *Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H. et al.* Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors // *Ibid.* — 2008. — V. 322, N 5903. — P. 949–953.
11. *Onder T. T., Daley G. Q.* New lessons learned from disease modeling with induced pluripotent stem cells // *Curr. Opin. Genet. Dev.* — 2012. — V. 22, N 5. — P. 500–508.
12. *Lee G., Papapetrou E. P., Kim H. et al.* Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs // *Nature.* — 2009. — V. 461, N 7262. — P. 402–406.
13. *Doege C. A., Inoue K., Yamashita T. et al.* Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 and Tet2 // *Ibid.* — 2012. — V. 488, N 7413. — P. 652–655.
14. *Klabunde Th., Hessler G.* Drug Design Strategies for Targeting G-Protein-Coupled Receptors // *ChemBioChem.* — 2002. — V. 3, N 10. — P. 928–944.
15. *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.
16. *Rasmussen S. G., Choi H. J., Rosenbaum D. M. et al.* Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor // *Nature.* — 2007. — V. 450, N 7168. — P. 383–387.
17. *Rosenbaum D. M., Cherezov V., Hanson M. A. et al.* GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function // *Science.* — 2007. — V. 318, N 5854. — P. 1266–1273.
18. *Cherezov V., Rosenbaum D. M., Hanson M. A. et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor // *Ibid.* — 2007. — V. 318, N 5854. — P. 1258–1265.
19. *Rasmussen S. G., DeVree B. T., Zou Y. et al.* Crystal structure of the 2 adrenergic receptor-Gs protein complex // *Nature.* — 2011. — V. 477, N 7366. — P. 549–555.
20. *Thompson A. A., Liu W., Chun E., Katritch V. et al.* Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic // *Ibid.* — 2012. — V. 485. — P. 395–401.
21. *Granier S., Manglik A. et al. & Kobilka B.* Structure of the  $\delta$ -opioid receptor bound to naltrindole // *Ibid.* — 2012. — V. 485. — P. 400–405.
22. *Wu H., Wacker D., Mileni M., Katritch V., Han G-W., Vardy E., et al.* Structure of the human k-opioid receptor in complex with JD1c. // *Ibid.* — 2012. — V. 485. — P. 327–334.
23. *Manglik A. et al., Kobilka B. & Granier S.* Crystal structure of the  $\mu$ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist // *Ibid.* — 2012. — V. 485. — P. 321–327.
24. *Premont R. T., Koch W. J., Inglese J. et al.* Identification, purification, and characterization of GRK5, a member of the family of G protein-coupled receptor kinases // *J. Biol. Chem.* — 1994. — V. 269, N 9. — P. 6832–6841.
25. *Benovic J. L., Kühn 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.