

ХРОНІКА

СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ ТА РЕЦЕПТОРИ, ПОВ'ЯЗАНІ З G-ПРОТЕЇНАМИ, – ЗНОВУ НА ПЕРЕДОВІЙ НАУКИ

Щорічна церемонія вручення Нобелівських премій, яка традиційно проходить 10 грудня – у день смерті шведського підприємця і винахідника Альфреда Нобеля (1833–1896), засновника Нобелівських премій, привертає неабияку увагу не тільки науковців, а й широкого загалу, адже ця нагорода є беззаперечним свідченням визнання світовою науковою спільнотою значущості роботи вченого.

8 жовтня 2012 р. в Стокгольмі розпочався 111-й Нобелівський тиждень, і традиційно першими було оголошено лауреатів премії з фізіології та медицини – однієї з найпрестижніших нагород у галузі біології. За правилами Нобелівського фонду імена провідних світових учених, що претендували на цю премію, буде оприлюднено лише через 50 років. Втім, експерти серед претендентів на цю нагороду називали Чарльза Девіда Елліса і Майкла Грюнштейна (США), що займаються вивченням гістонів – протеїнів, які відповідають за тривимірну упаковку молекул ДНК в хромосомах; Річарда О. Хайнса і Ерккі Руослахті (США) та Масатоші Такейчі (Японія), що відкрили молекули клітинної адгезії; а також Франца-Ульріха Хартля (Німеччина) і Артура Горвіча (США), дослідивших механізм укладання молекул протеїнів у певну тривимірну структуру, необхідну для їх роботи.

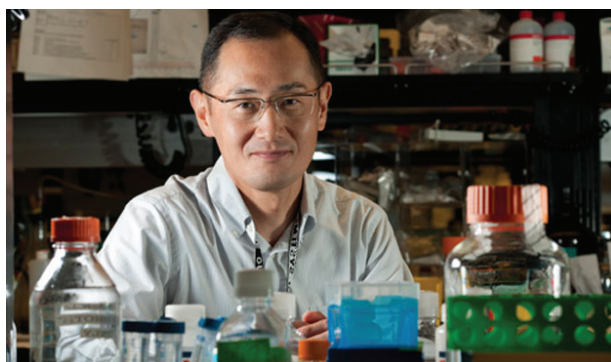
Однак цьогорічними лауреатами Нобелівської премії з фізіології та медици-

ни (200-м і 201-м за рахунком) стали британець *Джон Гердон* (John Bertrand Gurdon) з кембріджського Гердонівського інституту (Gurdon Institute) в Кембріджі 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 зазначено в офіційному формулюванні Нобелівського комітету премію присуджено за «відкриття можливості перепрограмування диференційованих клітин в плюрипотентні».

Джон Гердон народився 2 жовтня 1933 р. у м. Діппенхол (Велика Британія). Після навчання в Ітонському коледжі він вступив до Крайст-Черч коледжу Оксфордського університету, де спочатку вивчав антикознавство, але згодом перейшов на зоологію. Після здобуття PhD ступеня Гердон продовжив наукову діяльність у Каліфорнійському технологічному інституті. У 1962–1971 рр. він працював на кафедрі зоології Оксфордського університету, а в 1971–1983 рр. – в лабораторії молекулярної біології Кембріджського університету. З 1983 р. дотепер він є співробітником кафедри зоології Кембріджського університету. У 1989 р. Гердон заснував у Кембріджі Інститут клітинної біології та онкології і до 2001 р. обіймав посаду його керівника. У 1991–1995 рр. він був членом Наффілдської ради з біоетики, а в 1994–2002 рр. – магістром коледжу Магдалени Кембріджського університету.



Сер Джон Бертран Гердон в лабораторії



Шінія Яманака в лабораторії

Шінія Яманака народився 4 вересня 1962 р. в м. Осака (Японія). В 1987 р. отримав вищу медичну освіту в Університеті Кобе за спеціальністю ортопедія. В 1993 р. захистив ступінь доктора в галузі фармакології у Вищій школі Університету м. Осака. У 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 (Японія) – директор Центру дослідження і застосування іPS-клітин, а також провідний дослідник Інституту серцево-судинних захворювань Гледстоуна (Сан-Франциско).

У 2009 р. Джона Гердона і Шінію Яманака було нагороджено почесною премією Альберта Ласкера (її називають «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 Millenium. У 1995 р. Джону Бертрану Гердону присвоєно титул лицаря-бакалавра, а в 2004 р. кембриджський Інститут клітинної біології та раку при благодійних фондах Wellcome Trust і Cancer Research (UK) був перейменований 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 дуже сильно відрізнитись 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 можливо? Виявляється, що відмінності між соматичними клітинами різних типів обумовлені 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 все помітнішими (рис. 1). Причиною їх виникнення є те, що клітини за-

родка опиняються в різних умовах: щільність речовин в різних ділянках зиготи є різною, на клітини різних ділянок зародка певні фізичні параметри впливають по-різному, з часом самі клітини починають впливати одна на одну, виділяючи ті чи інші біологічно активні речовини. Поступово клітини утворюють три шари – зовнішній (ектодерму), середній (мезодерму) і внутрішній (ентодерму). Потім клітини цих шарів починають дедалі більше відрізнитися одна від одної і врешті-решт утворюють всі органи і тканини організму. Таким чином, 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 був запропонований у 1909 р. видатним російським вченим Олександром Максимовим, який передбачив існування таких клітин крові, які здатні дати початок декільком іншим типам клітин. У 1960-х рр. канадці Джеймс Тілл і Ернст МакКаллох, досліджуючи процес гемопоєзу, вперше виявили стовбурові клітини. В 1981 р. американський біолог Мартін Еванс вперше 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 клітини і органи. (Між іншим, перша в СРСР наукова конференція, присвячена стовбуровим клітинам, відбулася в Києві у 1977 р. на базі Інституту проблем онкології АН УРСР за ініціативи академіків АН УРСР Р. Є. Кавецького та З. А. Бутенко, а одні з перших публікацій у світі з морфології стовбурової клітини теж належали українським вченим [1, 2].

Залежно від джерела одержання стовбурові клітини можна розділити на три групи: ембріональні, які одержують із внутрішньої клітинної маси бластоцисти на ранній стадії розвитку зародка; фетальні, які одержують із плодового матеріалу після абортів, та постнатальні, що є стовбуровими клітинами дорослого організму. Використання ембріонів для одержання ембріональних і фетальних стовбурових клітин пов'язане з етичними проблемами, а постнатальні стовбурові

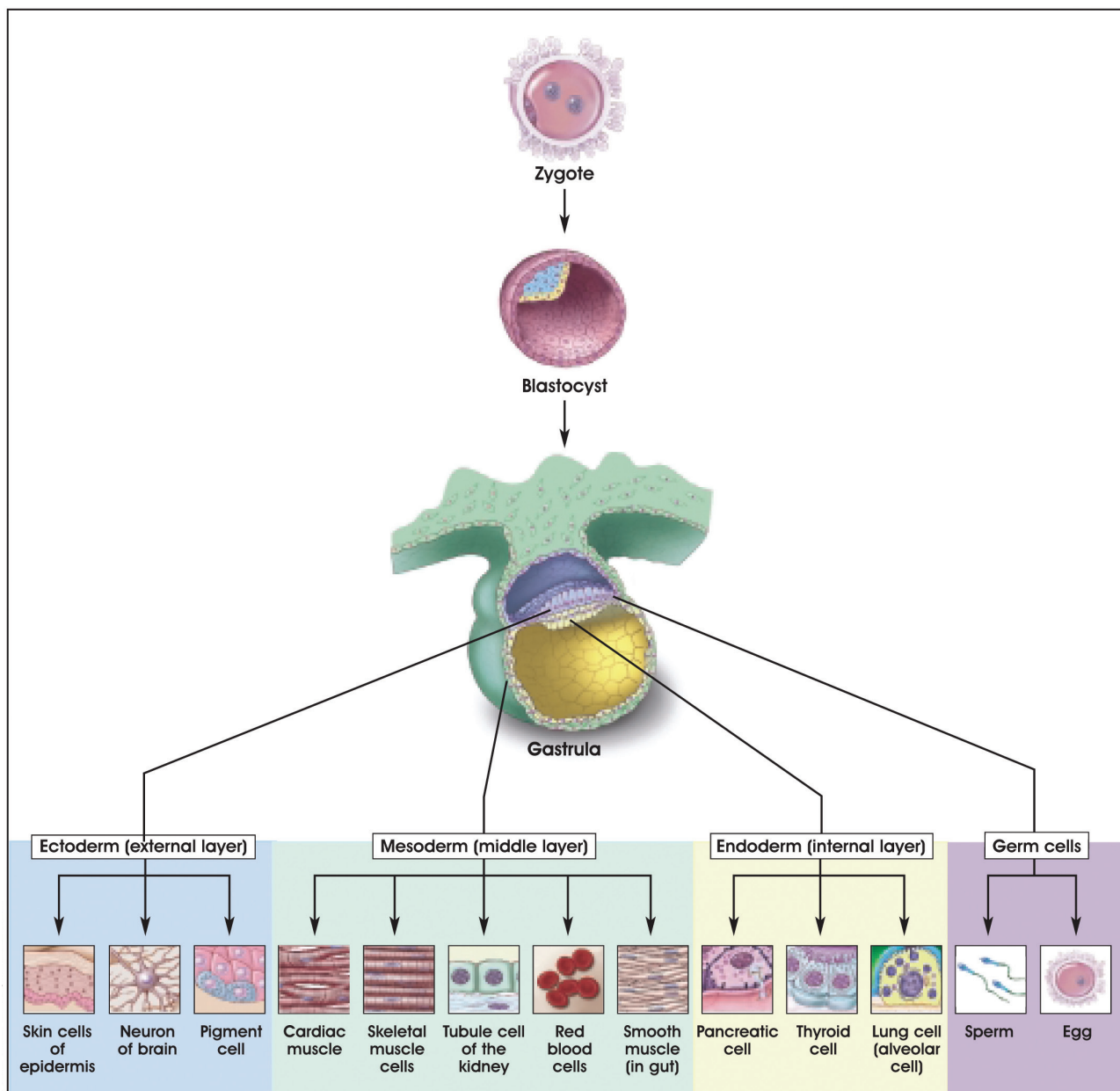


Рис. 1. Диференціація тканини людини (<http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/chapter1.pdf>)

клітини виявляють 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.

Найуніверсальніші стовбурові клітини, наприклад, зигота та бластомери – клітини, що утворилися під час декількох перших ділень зиготи, можуть дати початок цілому організму. Такі клітини називаються тотипотентними стовбуровими клітинами. Менш універсальними є плюрипотентні стовбурові клітини, що утворюються під час декількох наступних зародкових ділень (до поділу

на зародкові листки) і можуть дати початок всім клітинам організму, крім плаценти. Спеціалізовані мультипотентні стовбурові клітини можуть дати початок клітинам різних типів, але не всім. Поступове диференціювання нащадків мультипотентних клітин приводить до появи олігопотентних (що дають початок тільки невеликій кількості типів клітин) і уніпотентних (що дають початок тільки одному типу) клітин. Отже, в кожному організмі під час розвитку відбувається процес поступового диференціювання клітин і втрати ними поліпотентності (як вважалося раніше, шляху назад немає).

Однак Джон Гердон і Шінія Яманака завдяки своїй наполегливій праці довели, що це не так, за що вони власне і отримали Нобелівську премію.

Експерименти з клонування робив ще у 1914 р. німецький вчений Ганс Шпеман, який вперше пересадив ядро з однієї клітини до іншої. У 1940-х рр. російський ембріолог Георгій Лопашов розробив метод пересадки клітинних ядер в яйцеклітину жаби, однак разом з іншими радянськими дослідниками він зазнав гонінь і не зміг продовжити цю роботу. Джон Гердон вдосконалив методику Г. Лопашова і продовжив дослідження трансплантації ядер в клітини бластул, які було проведено Бриггсом і Кінгом в 1952 р. Робота, ви-

конана Джоном Гердоном в Оксфордському університеті в 1958 р. та опублікована в 1962 р., 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 організму. Для цього він опроміненням зруйнував опроміненням ядро яйцеклітини шпорцевої жаби (*Xenopus laevis*) та пересадив в таку без'ядерну клітину ядро диференційованої клітини (клітини епітелію кишечника пуголовка). Подібні експерименти проводилися раніше іншими дослідниками, але саме Гердону вдалося одержати з такої «химерної» яйцеклітини здорового пуголовка. Більше того, у двох відсотках випадків пуголовка перетворювались на дорослих жаб (рис. 2).

Цей експеримент довів, що геном соматичної клітини містить всю інформацію, яка є в яйцеклітині, а значить, диференціювання клітин не пов'язане з деградацією частини генів. Результати роботи Гердона спочатку було сприйнято скептично, але після підтвердження вони докорінно змінили тогочасні уявлення про диференціювання клітин: виявилось, що диференційована клітина може відновити плюрипотентність, тобто процес диференціювання може бути оберненим. Відкриття Гердона спричини-

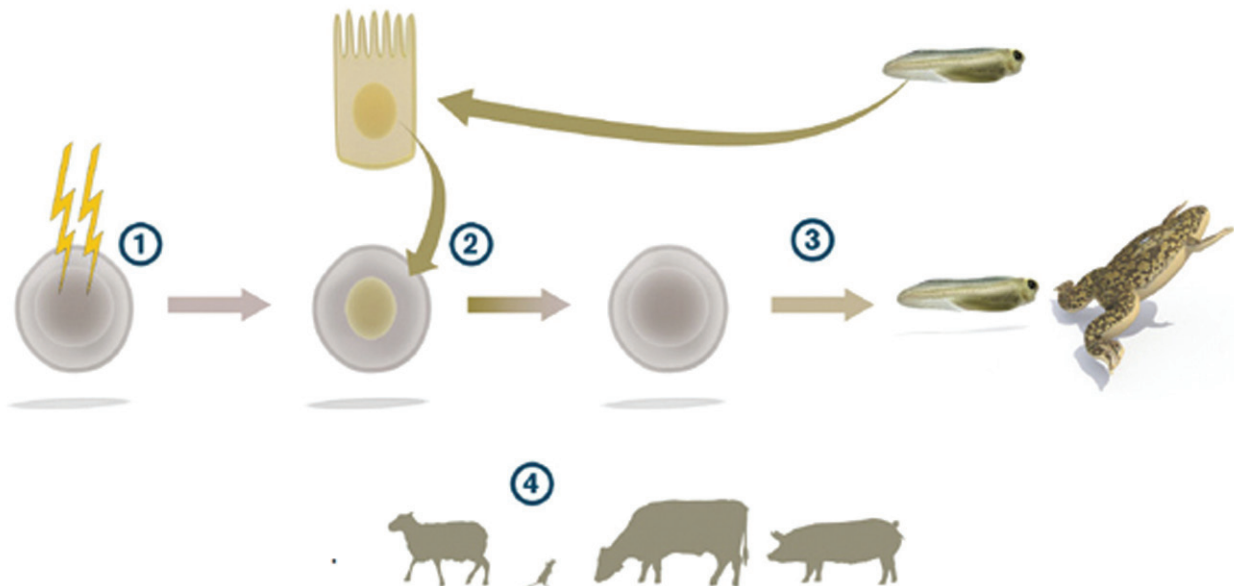


Рис. 2. Схема експериментів Гердона. Він знищив ультрафіолетом ядро в ікринці шпорцевої жаби *Xenopus laevis* (1), пересадив туди ядро, яке було взяте з диференційованої клітини кишечника пуголовка того самого виду (2), внаслідок чого з ікринки розвинувся пуголовок, а потім і доросла жаба (3). Так само можна одержати й організми ссавців (4). Зображення із сайту www.nobelprize.org

ло лавину досліджень. З цього експерименту, зокрема, беруть початок всі роботи із клонування тварин. До речі, термін «клон» вперше було використано по відношенню до тварин у 1963 р. британським вченим Джоном Холдейном під час описання результатів Гердона. Подальші роботи Гердона було присвячено дослідженню міжклітинних сигнальних чинників, задіяних у диференціюванні клітин, а також дослідженню механізмів відновлення плюрипотентності в експериментах із трансплантації ядер, зокрема, ролі метилування ДНК в цьому процесі.

Цікавим збігом є те, що у 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 із 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, яке якимось загадковим чином приводить хромосоми у вихідний стан, в якому вони були в щойно заплідненій яйцеклітині. Однак залишалося невідомим, які чинники в яйці обумовлюють 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) у плюрипотентну стовбурову клітину без пересаджування ядра [5]. Одержані ним клітини назвали індукованими плюрипотентними стовбуровими клітинами (iPSC). Яким же чином вдалося це зробити?

З часів експериментів Гердона було розроблено методи генної інженерії, які дозволяли вставляти в клітину ген, який успішно в ній експресувався, і, таким чином, відбувався синтез протеїну, кодованого цим геном. Одним із способів доставляння гену в клітину є використання вірусів (наприклад, ретровірусів), в яких частина генетичного матеріалу замінено на гени необхідних протеїнів. Після зараження клітини цим вірусом відбувається вбудовування вірусної ДНК в геном клітини та синтез відповідних протеїнів, які, в свою чергу, можуть впливати на фізіологічні процеси в клітині та на експресію інших генів. Завдяки розробці таких методик стали можливими експерименти з одержання iPSC.

Яманака займався вивченням механізмів підтримки плюрипотентності в ембріональних стовбурових клітинах (ЕСК) миші (рис. 3). Він виявив понад 1000 генів, що характеризу-

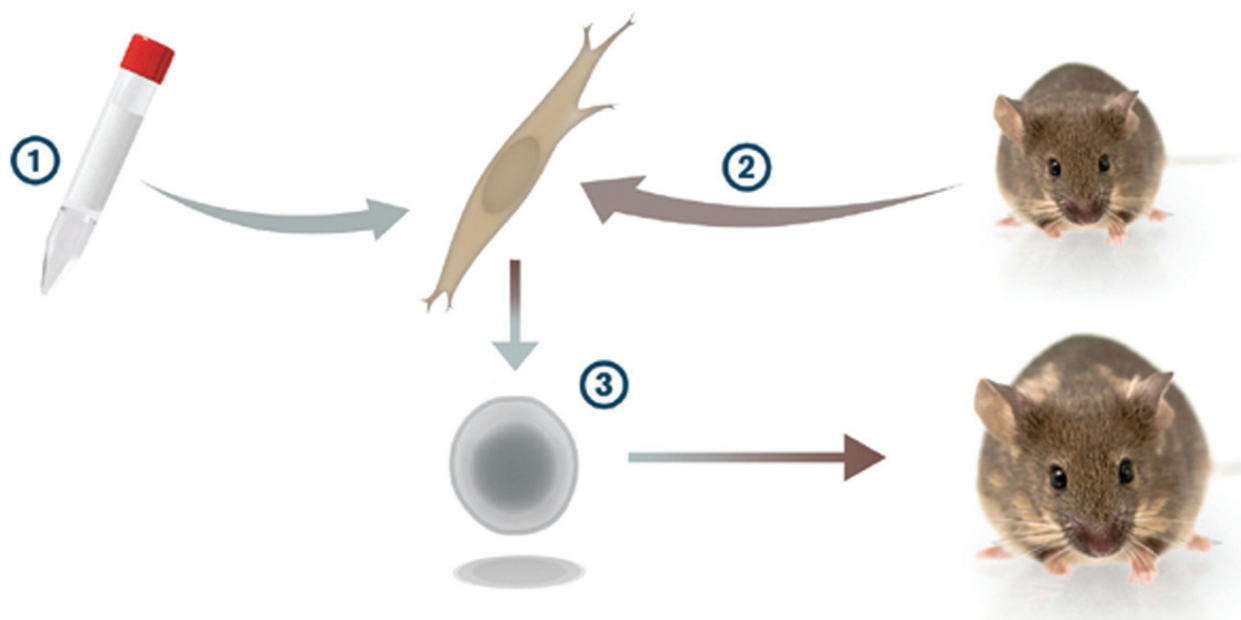


Рис. 3. Схема експериментів Яманаки. Гени чотирьох протеїнів (1) занурюються в диференційований фібробласт, одержаний від миші (2). Цей фібробласт перетворюється в плюрипотентну стовбурову клітину (3), з якої можна потім одержати дорослий мишиний організм (4). Зазначимо, що дорослу мишу із плюрипотентних клітин одержав усе ж таки не Яманака. Зображення із сайту www.nobelprize.org

валися підвищеною активністю в ЕСК, і для дослідження ролі цих генів вирішив вставити їх в різних комбінаціях у диференційовані клітини. Звичайно перевірити всі комбінації було неможливо, тим більше, що спрацювати могла будь-яка комбінація з цих генів. Тому пошук обмежили декількома десятками генів – найімовірніших 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. Крім того, було показано, що одержані плюрипотентні стовбурові клітини можна примусити знову диференціюватися в клітини різних тканин. У 2007 р. Яманака одержав повністю епігенетично перепрограмовані іPS-клітини миші, з яких вдалося одержати дорослих мишей [6]. Іншими дослідниками в 2009 р. було одержано тетраплоїдні іPS-клітини, що своїми властивостями більше нагадували ЕСК і теж були здатні розвинути у дорослих мишей [7].

Після того, як Яманака одержав позитивні результати в експериментах із клітинами мишей, він випробував ту саму методику для одержання іPSC із клітин шкіри людини. Паралельно із групою Яманаки над цією проблемою працювала група Джеймса Томсона з Вісконсину (Медісон, США). Лабораторії Яманаки і Томсона були першими, хто одержав іPS-клітини людини [8, 9]. Для одержання цих клітин Яманака використав комбінацію з 4 генів, яку він раніше використовував для одержання іPS-клітин миші (Myc, Oct4, Sox2 та Klf4), в той час як Томсон використав дещо іншу комбінацію генів (Lin28, Nanog, Oct 4 та Sox2). Певний внесок у виконання цієї роботи вніс український вчений, який працював в лабораторії Томсона – Максим Водяник, який починав свої дослідження, що стосувались моноканальних 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, воно надало дослідникам фантастичні можливості та відкрило значні перспективи використання іPS-клітин у багатьох галузях медицини. Звичайно, перше, що спадає на думку, – можливість використовувати іPSC для відновлення органів і тканин, старих або пошкоджених. Якщо буде розроблено методику штучного «виращування» певних тканин людського тіла, відбудеться революція в трансплантології, адже клітини,

одержані з іPSC, є генетично ідентичними з клітинами організму, з якого їх було одержано, і вони не здатні спричинити імунне відторгнення трансплантатів. Такі клітини можуть бути застосовані для боротьби з дегенеративними захворюваннями, наприклад, з хворобою Паркінсона та діабетом I типу, 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 викликала етичні проблеми та була в багатьох країнах або заборонена, або пов'язана із серйозними юридичними труднощами через те, що єдиним джерелом цих клітин були людські ембріони, які знищувались для виділення ЕСК. Яманака відкрив спосіб одержання плюрипотентних стовбурових клітин у необхідній кількості та зняв ці обмеження. Однак, поки що рано говорити про припинення використання ЕСК, оскільки існує багато перешкод, які необхідно подолати на шляху до повного розуміння явища плюрипотентності та одержання іPS-клітин, придатних для лікування людей.

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

Тому протягом останніх років було розпочато дослідження, які дозволять в майбутньому зробити використання клітин, одержаних з іPSC, безпечним для лікування пацієнтів. У 2008 р. в лабораторії Яманаки було одержано іPS-клітини без використання вірусних векторів, що інтегруються в ДНК [10]. Зараз продовжується робота над розробкою нових методик одержання іPS-клітин і без використання ретровірусів для введення їх в ДНК, а з застосуванням хімічних реактивів або безпечніших вірусів.

На сьогодні клітини, одержані з іPSC, не підходять для заміни пошкоджених клітин або тканин у пацієнтів, але такі клітини є ідеальними як модельна система для вивчен-

ня причин виникнення захворювань, розробки методів їх лікування та нових лікарських препаратів. Наприклад, дослідники можуть зробити iPSC із клітин людини із хворобою Альцгеймера і перетворити їх на нейрони в чашці Петрі (такий підхід ще називають «захворювання в чашці Петрі»). Це дозволяє досліджувати патогенез і розробляти методи профілактики та лікування цього захворювання. iPSC можуть бути також використані для токсикологічного тестування та підвищення ефективності ліків. Крім того, можна проводити скринінг лікарських препаратів та обирати найефективніше та економічно обґрунтоване лікування для кожного конкретного пацієнта.

Зараз вже одержано 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. Дослідження сімейної дисаутономії на такій моделі дозволило відкрити новий фактор – кінетин, що відіграє важливу роль у виникненні цього захворювання [12]. Експерименти останніх років спрямовані на вивчення механізму перепрограмування соматичних клітин в iPSC. Показано, що під час такого перепрограмування відбувається стирання соматичних епігенетичних підписів, які представлені метилуванням ДНК або модифікацією пістонів, в локусі плюрипотентності і створення альтернативних епігенетичних міток ембріональних стовбурових клітин. Наприклад, з'ясовано, що для одержання iPSC два фактори *Parp1* і *Tet2* мають реалізувати такі епігенетичні модифікації в локусах *Nanog* та *Esrrb* [13].

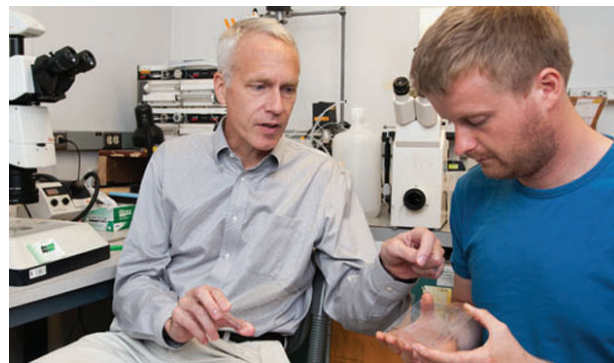


Роберт Лефковіц в лабораторії

Звичайно, розробка ефективних і безпечних методик перетворення соматичних клітин в плюрипотентні потребує значних зусиль і подальшої тривалої роботи, але дослідження останніх років дають надію, що досягнення успіху в цьому напрямі є можливим і навіть досить швидким.

В наш час найцікавіші та найперспективніші наукові роботи виконуються, як правило, на стику, або, правильніше, на перетинанні традиційних дисциплін, однак Нобелівські премії досі присуджуються в жорстко розмежованих галузях медицини або фізіології, фізики та хімії. Намагаючись утримуватись в цих жорстких рамках, Нобелівський комітет все частіше присуджує премію з хімії за досягнення в області біохімії, які мають безпосереднє відношення до фізіології та медицини. Так, 10 жовтня 2012 р. було оголошено, що цьогорічну **Нобелівську премію з хімії** отримали два американських професора – *Роберт Лефковіц* з університету Д'юка в Північній Кароліні і *Брайан Кобилка* зі Стенфордського університету в Каліфорнії – за дослідження рецепторів, пов'язаних з G-протеїнами (GPCR – G-protein-coupled receptors) (рис. 4). Обидва вчених мають медичну освіту, а за відкриття та вивчення самих G-протеїнів у 1994 р. Альфреду Гілману та Мартіну Родбеллу було присуджено Нобелівську премію з фізіології та медицини.

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



Брайан Кобилка в лабораторії

у системі Національних інститутів здоров'я та в Головному госпіталі штату Массачусетс в Бостоні (MGH), а в 1973–1976 рр. – в американській кардіологічній асоціації (American Heart Association). Із 1973 р. він працює в Університеті Д'юка, а з 1976 р. – в Медичному інституті Говарда Хьюза. У 2007 р. Лефковиц був удостоєний Національної медалі науки (National Medal of Science), що вручається за указом Президента США, та отримав азіатський аналог Нобелівської премії – премію Шоу (Shaw Prize).

Брайан Кобилка (Brian Kobilka) народився в 1955 р. в штаті Міннесота в родині з німецько-польським корінням. Він отримав ступінь бакалавра з біології та хімії в Міннесотському університеті, потім ступінь доктора медицини (MD) на медичному факультеті Єльського університету. Після інтернатури у Вашингтонському університеті Кобилка поступив працювати в лабораторію Лефковица. У 1987–2003 рр. він працював в Медичному інституті Говарда Хьюза. Нинішня лабораторія Кобилки знаходиться в Стенфордському університеті. У 2007 р. журнал Science назвав його дослідження структури GPCR проривом року.

GPCR – це родина схожих за структурною організацією та за функцією рецепторів мембран еукаріотичних клітин, які мають сім трансмембранних доменів та передають у середину відповідної клітини сигнал завдяки активації GTP-зв'язуючих 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, тому що на схемі перетинання плазматичної мембрани клітини GPCR протеїнами розташу-

вання доменів GPCR носить «змієподібний» характер. В геномі людини знайдено близько 800 генів, що кодують різні GPCR. Функція 150 з них залишається невідомою, решта – «розпізнають», тобто специфічно взаємодіють із 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 навколишнього середовища клітини. Велика кількість найважливіших для функціонування організму процесів контролюються GPCR, як, наприклад, 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 у функціонуванні GPCR спостерігаються при багатьох тяжких захворюваннях, наприклад, при діабеті, сліпоті, алергії, депресії, серцево-судинних порушеннях і деяких формах злоякісного росту. На фармацевтичному ринку від третини до половини кількості усіх ліків складають препарати, дія яких спрямована на GPCR. Тому дослідження структури цих рецепторів (GPCR) і механізмів передачі ними сигналів у клітинах-мишенях є важливими для глибшого розуміння причин багатьох захворювань та створення ефективних ліків із мінімальними побічними ефектами.

Вивчення GPCR (GPC-рецепторів) розпочалося ще в XIX столітті, коли німецький вчений Вільгельм Кюне в 1870 р. виявив і виділив рецептор, що реагує на світло – ро-

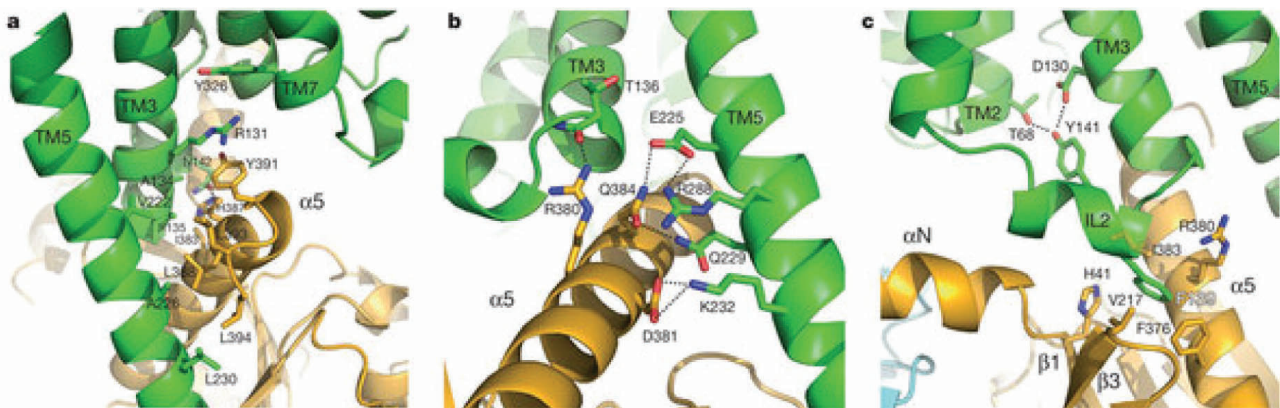


Рис. 4. Взаємодії рецепторів, пов'язаних з G-протеїнами (<http://www.nature.com/nature/journal/v477/n7366/full/nature10361.html>)

допсин. В подальшому вивчення механізму регулювання скорочення м'язових клітин під впливом певних речовин дозволило на початку 70-х років XX століття зробити висновок, що існує деяка рецепторна субстанція, яка реагує на позаклітинні молекули і передає сигнали всередину клітини.

Метою роботи Роберта Лефковица 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, здатними гідролізувати гуанозинтрифосфат — GTP, які спричинюють 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 із радіоактивно міченим адреналіном в 1980 р. Лефковіц і його команда запропонували найімовірніший механізм дії адренорецепторів — «теорію трійчастого комплексу». Згідно з цією теорією з внутрішньої сторони мембрани до адренорецептора, що знаходиться в мембрані клітини, прилягає G-протеїн, який складається із трьох субодиниць α , β і γ і зв'язаний з молекулою гуанозиндифосфату (GDP). У разі зв'язування адреналіну з рецептором відбуваються складні конформаційні перебудови рецептора, що зумовлює спочатку міцне приєднання G-протеїну, а потім його активацію та відділення. Під час активації молекула гуанозиндифосфату (GDP) фосфорилується до молекули гуанозинтрифосфату (GTP), і G-протеїн розпадається на дві частини: α -субодиниця—GTP та β -субодиниця— γ -субодиниця, які активують вторинні посередники та спричинює 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 адренорецептора.

Для того, щоб з'ясувати, як адренорецептор зв'язується з лігандом, яким чинно відбувається активація G-протеїну, необхідно було одержати рецептор у великій кількості, знайшовши його ген і клонувавши його. Це дуже складне на той час завдання Лефковіц поставив перед Брайаном Кобил-

кою — молодим співробітником, що з'явився в його лабораторії. У 1986 р. Кобилка разом з іншими співробітниками лабораторії частково розшифрував амінокислотну послідовність β -адренорецептора, по шматочках зібрав цілий ген, зміг його клонувати і навчився виділяти рецептор у великій кількості. Виявилось, що адренорецептор складається із семи трансмембранних α -спіралей і дуже подібний до родопсину, структуру якого було досліджено завдяки роботам декількох лабораторій, зокрема радянських учених під керівництвом академіка Ю. А. Овчинникова. Це дозволило зробити припущення, що за принципом трійчастого комплексу працюють не тільки β -адренорецептор і родопсин, але і більша частина інших, відомих на той час, рецепторів. Це припущення пізніше підтвердилося, і стало ясно, що передача сигналів за допомогою GPCR є універсальним механізмом спілкування клітин з іншими клітинами та навколишнім середовищем. Надзвичайна гнучкість реакції клітин на зміни навколишнього середовища (зв'язування рецептора з лігандом може бути причиною абсолютно різних реакцій) пояснювалася різним субодиничним складом G-протеїнів та різним набором вторинних посередників.

Для вивчення механізму роботи GPCR необхідно було одержати інформацію про просторову структуру їх за допомогою рентгеноструктурного аналізу. Однак тривалий час це не вдавалося зробити, незважаючи на наполегливу працю багатьох лабораторій світу, через те, що рецептори GPCR є жиророзчинними і в звичайних умовах не піддаються кристалізації.

У 2000 р. Кржиштоф Пальчевський та його співробітник Тетсуї Окада з Університету Кейс Вестерн Резерв (Case Western Reserve University) в Клівленді (США) успішно здійснили рентгено-структурний аналіз родопсину [14], але Брайану Кобилці та Рею Стівенсу вдалося вперше одержати структуру адренергічного рецептора людини лише в 2007 році [15–17]. Вагомий вклад у цю роботу зробив Вадим Черезов із лабораторії Рея Стівенса, який оптимізував умови для кристалізації рецептора в ліпідній кубічній фазі з використанням холестеролу. В 2007–2012 рр. лабораторіями Кобилки і Стівенса були визначені структури 15 різних GPCR, у тому числі опіоїдних рецепторів, що відкривало можливості для розробки нових лікарських препаратів: знеболюючих засобів, антидепресантів, ліків для боротьби з наркозалежністю та з відчуттям тривоги. Однак мрією Брайана Кобилки

було одержати структуру комплексу активованого β -адренорецептора з G-протеїном в момент його активації, щоб мати повне уявлення про механізм дії цього рецептора. І ось у 2011 році, завдяки застосуванню методів молекулярної інженерії та стабілізації протеїну антитілами, Кобилці вдалося кристалізувати сигнальний 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 передачі сигналу від рецептора до G-протеїну [18].

Таким чином, завдяки багаторічним зусиллям Лефковица, Кобилки та інших вчених, людство дізналося про існування унікального сімейства рецепторів, пов'язаних з 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 завжди буває в науці, визначне відкриття, даючи відповідь на одне питання, порушує низку інших. Вченим ще слід 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 увага багатьох дослідників в усьому світі зараз прикута до рецепторів GPCR.

Лабораторія Брайана Кобилки вивчає фізіологічну роль та механізм дії різних типів адренергічних рецепторів із використанням ліній нокаутних мишей, в яких штучно видалений ген, що кодує той чи інший тип рецептора, і тому відсутній відповідний рецептор. Одержані дані можуть бути корисними для розробки нових підходів лікування серцевої недостатності в людей. Лабораторія Роберта Лефковица вивчає механізми зміни функціонування рецепторів під впливом лігандів, з якими вони взаємодіють (гормонів, ліків тощо), тобто вивчає природу явища десенсibilізації рецепторів, яке обумовлює стійкість до дії ліків або зниження їх ефективності з часом. Лефковіц із співробітниками відкрив низку протеїнів, які зумовлюють десенсibilізацію рецепторів: по-перше, це кінази рецепторів, пов'язаних з G-протеїнами (GRKs) [19], які фосфорилують активовані рецептори, тим самим змінюючи їхню структуру; по-друге — арестини, що

зв'язують фосфорильовані рецептори, перешкоджаючи їх нормальному функціонуванню [20]. Виявилось, що ці протеїни не тільки спричиняють десенсibilізацію рецепторів (GPCR), але й виконують функції сигнальних протеїнів, запускаючи каскад реакцій під час блокування активації G-протеїну рецептором. Значення цього каскаду невідоме і потребує подальших досліджень.

Розуміння механізму дії арестинів і GRKs може призвести до розробки нових ліків і нових методів лікування захворювань людини. Зараз для лікування серцево-судинних захворювань найчастіше використовують блокатори двох типів GPCR: β -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 спричинює небажані побічні ефекти. Натомість запуск каскаду арестинів дозволяє досягти більш гнучкої регуляції їхньої активності.

Відкриття, відзначені цього року Нобелівськими преміями з фізіології та медицини, а також із хімії, можливо, вже в недалекому майбутньому призведуть до появи медицини нового покоління, коли стануть можливими безперешкодні трансплантації будь-яких тканин, а ефективні і безпечні ліки будуть підбиратися для кожного конкретного пацієнта після тестувань на клітинних моделях, одержаних з iPSC, та згідно з генетичною інформацією про його GPCR. Результати досліджень лауреатів Нобелівської премії, дають надію на те, що багато невиліковних в наш час захворювань будуть переможені, і, хто знає, можливо давня мрія людства про вічну молодість і безсмертя виявиться не такою вже й нездійсненною.

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. и др. Ультраструктура мононуклеаров костного мозга, маркированных антистволовоклеточной сывороткой с помощью PAP-метода // *Гематология и трансфузиология.* — 1983. — 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. – N 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 – **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. – **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. – **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. – **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. – **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. – **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. – **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. – **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. – **488**, N 7413. – P. 652–655.
14. Palczewski K., Kumasaka T., Hori T. et al. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. // *Science.* – 2000. – **289**, N 5480. – P. 739–745.
15. Rasmussen S. G., Choi H. J., Rosenbaum D. M. et al. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. // *Nature.* – 2007. – **450**, N 7168. – P. 383–387.
16. Rosenbaum D. M., Cherezov V., Hanson M. A. et al. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. // *Science.* – 2007. – **318**, N 5854. – P. 1266–1273.
17. 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. – **318**, N 5854. – P. 1258–1265.
18. Rasmussen S. G., DeVree B. T., Zou Y. et al. Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. // *Nature.* – 2011. – **477**, № 7366. – P. 549–555.
19. Premont R. T., Koch W. J., Inglese J., Lefkowitz R. J. Identification, purification, and characterization of GRK5, a member of the family of G protein-coupled receptor kinases. // *J. Biol. Chem.* – 1994. – **269**, N 9. – P. 6832–6841.
20. 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. – **84**, N 24. – P. 8879–8882.

С. І. Романюк, С. В. Комісаренко
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ;
e-mail: sir@biochem.kiev.ua;
svk@biochem.kiev.ua