

НА ПЕРЕДНЕМ КРАЕ НАУКИ

Лауреаты Нобелевской премии 2012 года в области физиологии или медицины

Р.И. Сениашвили



Нобелевскую премию по физиологии и медицине в 2012 году получили Джон Гёрдон (John B. Gurdon) и Шинья Яманака (Shinya Yamanaka) «за открытие факта, что зрелые клетки могут быть «перепрограммированы» обратно в плюрипотентное состояние». В исследованиях лауреатов было обнаружено, что зрелые, специализированные клетки могут быть перепрограммированы в незрелые клетки, способные развиваться в различные ткани организма. Как отмечается в документе Нобелевской ассамблеи Каролинского института, которая присуждает премии в этой номинации, открытие Гёрдона и Яманак «революционизировало наше представление о развитии клеток и организмов».

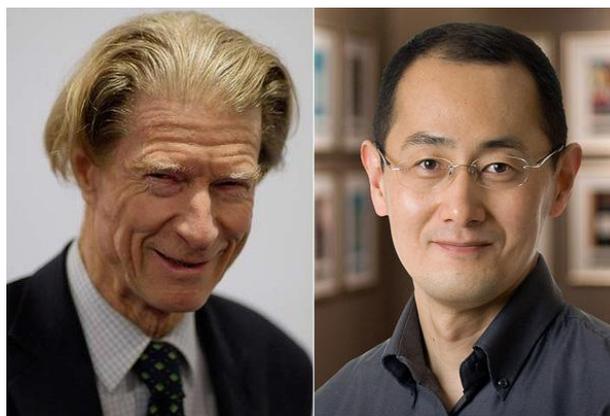
Сэр Джон Гёрдон родился в 1933 году в Диппенхолле, Великобритания, учился в Оксфордском университете, в настоящее время работает в Институте Гёрдона в Кембридже.

Шинья Яманака родился в 1962 году в Осаке, Япония. Окончил Университет Кобе, докторскую степень получил в Университете Осаки, в 1993 году приступил к работе в Институте Глэдстона (Gladstone Institute) в Сан-Франциско, США, одновременно занимаясь исследованиями в японском Институте науки и технологии Нара (Nara Institute of Science and Technology). В настоящее время он профессор Университета Киото и продолжает сотрудничество с Институтом Глэдстона. Исследования Яманак отмечены многими престижными наградами: в 2009 году он получил престижную американскую Премию Ласкерова, в 2010 – Премию Киото в номинации «Передовые технологии», в 2011 – израильскую премию Вольфа по медицине, а в 2012 году стал обладателем Большой премии Миллениум, которую называют «технологической Нобелевкой».

Премии Вольфа по медицине был удостоен и Джон Гёрдон – только раньше, в 1998 году. Но есть в его коллекции и более почетные награды. В июне 1995 года Джон Бертран Гёрдон получил звание рыцаря-бакалавра и право прибавлять к своему имени титул «сэр», а в 2004 году удостоился исключительно весомого признания: кембриджский Институт клеточной биологии и рака при благотворительных фондах Wellcome Trust and Cancer Research UK был переименован в Гёрдоновский институт.

Практически все комментаторы отмечают работы Гёрдона и Яманак как прорывные. Многие авторы поздравлений на «стене» Нобелевского комитета и вовсе называют их «новой эрой» в истории человечества.

Что же за прорыв в науке совершили эти ученые, принадлежащие к разным поколениям, чьи работы разделяет более 40 лет? Чтобы ответить на этот вопрос, придется начать издали.



*Джон Гёрдон
(John B. Gordon)*

*Шинья Яманака
(Shinya Yamanaka)*

Каждый многоклеточный организм состоит из множества типов клеток, которые могут очень отличаться друг от друга. Однако генетическая информация, хранящаяся во всех соматических типах клеток – от гепатоцита до нейрона, – абсолютно идентична. Как же это возможно?

Ответ прост: в разных типах клеток экспрессируются разные гены. То есть хотя весь геном во всех клетках одинаков, но действующая, рабочая часть генома в каждом типе клеток своя, и чем сильнее отличаются в двух клетках эти «рабочие» части генома, тем сильнее будут отличаться друг от друга сами клетки.

Почему же разные типы клеток так отличаются по экспрессии генов? Как известно, каждый многоклеточный организм развивается из одной-единственной клетки – зиготы. При первых делениях зигота дает почти одинаковые клетки, однако с каждым последующим делением различия между получающимися клетками увеличиваются. Причина этого в том, что разные клетки зародыша оказываются в разных условиях. Во-первых, зигота сама по себе несимметрична, и плотность различных веществ в разных ее участках отличается, поэтому при делении зиготы клетки, «получившие в наследство» тот или другой участок цитоплазмы, будут немного отличаться друг от друга. Во-вторых, на клетки в разных участках зародыша по-разному влияют определенные физические параметры, например сила тяжести: клетку в нижней части зародыша она будет «тянуть» в ту сторону, где нет других клеток, а клетку в верхней – наоборот, туда, где другие клетки есть. В-третьих, постепенно сами клетки начинают влиять друг на друга: выделяемые соседями ве-

щества меняют метаболизм клетки, запускают или выключают в ней экспрессию определенных генов и таким образом определяют ее судьбу. И так далее.

Итак, с каждым делением клетки все сильнее отличаются друг от друга и от зиготы, от которой они произошли. Постепенно клетки образуют три слоя – наружный (эктодерму), срединный (мезодерму) и внутренний (энтодерму). Затем клетки и в этих трех слоях начинают все сильнее отличаться друг от друга под влиянием соседних клеток и различных физических факторов и в конце концов образуют все органы и ткани организма. Таким образом, из совершенно недифференцированной зиготы получают терминально дифференцированные (то есть абсолютно специализированные) клетки.

Однако у терминально дифференцированных клеток есть один большой недостаток: они не могут делиться. А поскольку все они рано или поздно стареют, то, если где-то в организме не будет неисчерпаемых ресурсов дифференцированных клеток, организм очень быстро «износится» и умрет.

И такой ресурс есть. Это, конечно же, «стволовые клетки». Существование таких клеток постулировал и название для них придумал великий русский ученый Александр Максимов еще в 1908 году. Потомки стволовых клеток во взрослом организме постоянно обновляют ткани по схеме, изображенной на рисунке 1. Свое депо стволовых клеток существует у каждой ткани, даже у сердечной и нервной, в отношении которых раньше считалось, что они неспособны к восстановлению. Чем чаще обновляется ткань, тем больше у нее стволовых клеток: например, стволовых клеток кожи гораздо больше, чем нейральных. Каждая ткань состоит из нескольких типов клеток, и стволовые клетки этой ткани могут дать начало любому из них, но не клеткам другой, «неродной» ткани. Например, гемопоэтические стволовые клетки могут дать начало только клеткам крови, а нейронам – не могут. Стволовые клетки делятся постоянно, но очень редко; в случае, если ткань повреждена и нуждается в срочном восстановлении, они начинают делиться активной. Больше всего (из зрелых организмов) стволовых клеток у новорожденных младенцев; с возрастом их количество постепенно уменьшается, однако функционировать они продолжают даже в глубокой старости.

В процессе нормального развития каждая клетка проходит путь от изначального недифференцированного состояния, характерного для оплодотворенной яйцеклетки (зиготы) и клеток раннего эмбриона, до специализированных клеточных форм, медленно делящихся и служащих для выполнения всего спектра клеточных функций.

По мере развития, клетки становятся все более специализированными и все менее подверженными «неожиданным» превращениям. Во взрослом организме число стволовых клеток невелико и они располагаются в строго определенных местах (например, в костном мозге), играя роль источника для пополнения популяции дифференцированных клеток. Эта закономерность и сформировала представление, что развитие клеток возможно лишь в одном направлении, и никогда дифференциация не обернется вспять.

Однако теоретическая возможность «перепрограммирования» не исключалась полностью; Ханс Шпеман (Hans Spemann), нобелевский лауреат по физиологии и медицине 1935 года, первым предложил идею «пересадки» ядер дифференцированных клеток в цитоплазму яйцеклетки, чтобы изучить способность к дифференциации.

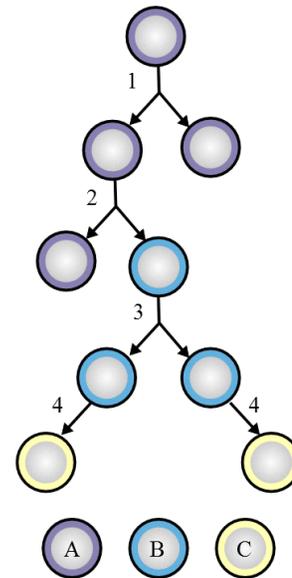


Рис. 1. Схема делений и дифференцировок стволовых клеток. А – стволовая клетка. В – клетка-предшественник. С – дифференцированная клетка. Каждая стволовая клетка может поделиться либо симметрично, дав две такие же стволовые клетки (1), либо несимметрично, дав одну стволовую клетку и одну клетку-предшественника (2). Клетка-предшественника тоже делится (3); ее дочерние клетки дифференцируются (4) и занимают свое место в той или иной ткани организма.

Первые попытки пересадки ядер были сделаны не Гёрдоном; еще в 1952 году Бриггс (Robert Briggs) и Кинг (Thomas King) разработали технологию «пересадки» ядра соматической клетки лягушки *Rana pipiens* в оплодотворенную икринку, ядро которой предварительно разрушали. Амфибии хорошо подходят для таких экспериментов, потому что их икра крупная и развивается не внутриутробно. В этой работе было показано, что пересадка ядра из эмбриональных клеток действительно может дать начало нормальному головастiku, но аналогичный опыт с более дифференцированными клетками к успеху не привел. Поэтому, хотя фактически они проделали ту же работу, что и Гёрдон несколькими годами позже, им пришлось сделать вывод, что дифференцированные клетки необратимы в своем развитии.

Джон Гёрдон выбрал для своих опытов другую лягушку – «ветерана» лабораторных исследований *Xenopus laevis*. Он уничтожил ядро яйцеклетки ультрафиолетовым светом и пересаживал в цитоплазму ядро от дифференцированной клетки эпителия, и в части опытов ему удалось получить нормально плавающих и развивающихся головастиков (рис. 2). Так что Гёрдону, в противоположность его предшественникам, удалось показать именно то, что пересадка ядра от дифференцированных клеток способна вернуть генетическую программу к состоянию плюрипотентности. Однако много лет прошло, прежде чем научное сообщество восприняло эти революционные работы всерьез. Исследования Гёрдона подвели подкоп под парадигму необратимости развития, впервые наглядно продемонстрировав, что ядро дифференцированной клетки вполне может быть возвращено на плюрипотентный этап и дать начало всем типам соматических и половых клеток, – если его поместить в цитоплазму яйцеклетки, «настроенной» на этот режим.

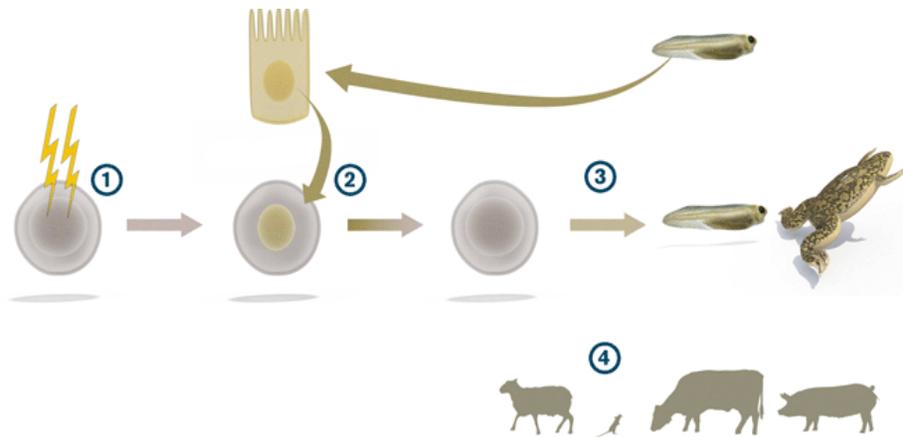


Рис. 2. Перепрограммирование ядра клетки эпителия лягушки. Гёрдон использовал ультрафиолет, чтобы разрушить ядро икринки лягушки (1), а потом пересаживал туда другое ядро, полученное из эпителия головастика (2). В большинстве случаев клетки погибли, однако несколько из них развились в головастиков и затем – во взрослых лягушек (3). Этот опыт подтвердил, что генетическая информация сохраняется неизменной на протяжении всего срока жизни клетки, и может в подходящих условиях быть задействована вновь. Более поздние исследования, основанные на том же принципе, привели к клонированию млекопитающих (4).

Работы Гёрдона положили начало технологии, называемой терапевтическим клонированием (somatic cell nuclear transfer). В 1997 году с помощью этого метода (конечно, с существенными изменениями) появилась на свет знаменитая овечка Долли. Важным дополнением стало то, что ядро перед пересадкой ввергали в покоящееся состояние, что позволяло лучше «синхронизировать» ядро с клеткой, его лишенной. С тех пор уже удалось клонировать довольно много млекопитающих – не только овцу, но и мышшь, корову, свинью, волка и степного кота. Метод пересадки ядер также позволил совершить ряд важных открытий в иммунологии.

Гёрдон наглядно доказал, что перенос ядра в окружение раннего эмбрионального развития способен «перезапустить» программу развития. Однако можно ли такое сделать, не извлекая ядро из клетки? Многие ученые продолжали считать это невозможным, полагая эпигенетические изменения, произошедшие в дифференцированной клетке, слишком далеко зашедшими, чтобы можно было их обра-

тить вспять. Наверное, так считал и Яманака, когда он начал заниматься эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК), впервые выделенными и культивированными Мартином Эвансом (Martin John Evans), лауреатом Нобелевской премии по физиологии и медицине 2008 года.

Лаборатория Яманаки работала над поиском факторов, поддерживающих в ЭСК программу плюрипотентности. Было найдено несколько десятков генов, активность которых в ЭСК была намного выше, чем в дифференцированных клетках, и, кроме того, уже открыли, что слияние ЭСК и специализированной клетки может дать две плюрипотентные клетки.

Вооруженная этим знанием, группа Яманаки внедрила в клетку (выбрали фибробласт) вектор с 24 генами, заставившими часть клеток дать колонии, подобные стволовым клеткам, и принялась по одному удалять гены из этого набора. В результате был установлен список из всего четырех генов, необходимых для «перепрограммирования» клетки: *Myc*, *Oct3/4*, *Sox2* и *Klf4* (рис. 3). Полученные клетки,

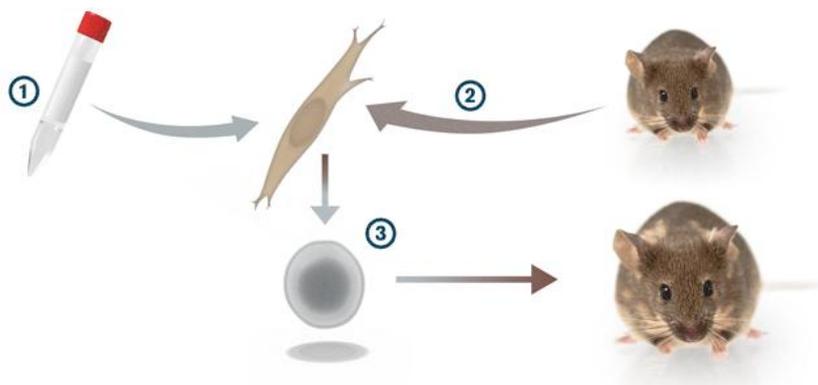


Рис. 3. Способ перепрограммирования специализированной клетки в стволовую. Начиная с набора 24 транскрипционных факторов и постепенно сужая этот перечень (1), Такахашии и Яманака установили, что всего четыре гена (*Myc*, *Oct3/4*, *Sox2* и *Klf4*) могут преобразить фибробласт, вернув его в состояние плюрипотентности (2). Полученные ИПСК (3) могут давать начало тератомам, что используется как маркер плюрипотентной клетки, а также использоваться в технологии получения химерных мышей (традиционно, для этого использовали ЭСК).

названные Яманакой индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК), получались в результате изобретенной процедуры с крайне низким выходом, но применяемые технологии селекции позволяют обнаружить даже одну перепрограммированную клетку на сотни тысяч. Далее последовала серия работ этой и других лабораторий, в которых исследователи оптимизировали состав перепрограммирующих факторов и способ введения вектора в клетку, чтобы повысить эффективность перепрограммирования и снизить вероятность образования опухолевых клеток в результате вызываемой метаморфозы.

Открытие Яманаки – важнейшее фундаментальное открытие в биологии, поскольку именно оно впервые продемонстрировало, что дифференцированная клетка может снова вернуться в «детство» и стать плюрипотентной. Весьма простая технология получения ИПСК мгновенно была взята на вооружение сотнями лабораторий по всему миру и существенно усовершенствована. В частности, теперь не нужно использовать векторы на основе ретровирусов, которые встраиваются в произвольное место генома и могут повредить его или даже запустить программу онкологической трансформации. Теперь используют аденовирусы или другие вирусные векторы, не встраивающиеся в хромосомы, а также РНК, белковые транскрипционные факторы и эписомальные плазмиды. В некоторых случаях число перепрограммирующих факторов можно снизить до одного – например, нейрональные стволовые клетки мышцы превращаются в ИПСК введением одного только фактора Oct4.

Открытие Яманаки также сообщило новый импульс поиску способов трансдифференцировки – то есть, превращению одного типа клеток в другой, минуя стадию стволовых клеток. Это возвращает нас в 1960–80 годы, к работам по имажинальному диску дрозофилы и к таким генам как Antennapedia, MyoD, GATA1 и Pax5. В частности, уже тогда удалось превратить фибробласты в миоциты активацией гена MyoD. Под впечатлением от работ Яманаки быстро нашли способ превратить экзокринные клетки поджелудочной железы в эндокринные, а фибробласты – в кардиомиоциты. Есть даже пример превращения друг в друга клеток разных зародышевых листков – мезодермальных фибробластов в эктодермальные нейроны (на что потребовалось три транскрипционных фактора).

Наиболее трепетные ожидания, связанные со стволовыми клетками, заключаются в возможности замещать больные или утраченные клетки прямо в ткани, восстанавливая организм буквально по клеточкам. В самом общем виде такая формула подходит для лечения практически любой

болезни – хоть Альцгеймера, хоть Паркинсона, хоть диабета, хоть последствий инфаркта. Конечно, это все находится в туманной дымке светлого будущего, но некоторые реальные перспективы тоже есть. В частности, клеточная терапия с применением ИПСК обещает освободить врачей от проблемы иммунной несовместимости. Конечно, особое внимание нужно уделить безопасности – ведь, как уже было сказано, ИПСК могут иметь как привнесенные при перепрограммировании мутации, так и быть онкогенными сами по себе. В общем, несмотря на то, что ИПСК сулят совершенно баснословные преимущества для медицины, пока что имеется «снежный ком» проблем, связанных с ними.

Другая перспектива, уже ставшая твердой действительностью, – возможность получать линии бессмертных клеток (ИПСК), соответствующих различным редким генетическим заболеваниям, и изучать как саму болезнь, так и действие на нее разрабатываемых лекарственных средств. ИПСК уже получены для таких заболеваний, как амиотрофический латеральный склероз (болезнь Шарко), синдром Ретта, спинальная мышечная атрофия (СМА), недостаточность антитрипсина $\alpha 1$, семейная гиперхолестеринемия, а также для различных кардиологических заболеваний. В некоторых из этих клеточных моделей удается связать наблюдаемый фенотип с болезнью: в частности, в случае клеток из СМА, это затухание функций моторных нейронов. Некоторый прогресс есть даже в изучении заболеваний со сложной генетикой, таких как шизофрения.

Исследуют на культурах специфичных для конкретных болезней ИПСК и действие разрабатываемых лекарств. В частности, на модели наследственной вегетативной дистонии проведен скрининг базы химических веществ и найден прототип лекарства кинетин, который способен частично обратить последствия нарушенного сплайсинга гена IKVAP, вызывающего эту болезнь. Аналогично, показано лекарственное действие бета-блокаторов и блокаторов ионных каналов на ИПСК из модели синдрома удлинения QT интервала. Так ИПСК уже вошли если не в клиническую, то в лабораторную практику и служат «испытательными стендами» для изучения различных болезней и действия на них разрабатываемых лекарств.

Открытие того, что зрелые дифференцированные клетки можно вернуть в плюрипотентное состояние или даже, минуя его, превратить один тип клеток в другой, стало поворотным в эмбриологии, биологии развития и всей молекулярной биологии. Это знание уже осветило все уголки физиологии и медицины, и практические применения в виде новых видов лечения наверняка не заставят себя ждать.

НА ПЕРЕДНЕМ КРАЕ НАУКИ

Лауреаты Нобелевской премии 2012 года в области химии

Р.И. Сениашвили



Нобелевская премия по химии в этом году на поверку оказалась премией по физиологии. Лауреатами премии по химии за 2012 год стали двое американских ученых – Роберт Лефковиц (Robert J. Lefkowitz), профессор медицины и профессор биохимии Медицинского центра Дьюкского университета в Дареме, штат Северная Каролина, и Брайан Кобилка (Brian K. Kobilka), профессор медицины и профессор молекулярной и клеточной физиологии Высшей медицинской школы Стэнфордского университета в Стэнфорде, штат Калифорния. Высшая в научном мире награда присуждена им за исследования рецепторов, сопряженных с G-белками.

Роберт Лефковиц родился в 1943 году в Нью-Йорке в семье еврейских эмигрантов из Польши. В 1962 году получил степень бакалавра искусств в Колумбийском колледже при Колумбийском университете Нью-Йорка, а в 1966 году в Колледже общей терапии и хирургии при том же университете получил степень доктора медицины (MD). С 1968 по 1970 год работал в системе Национальных институтов здоровья, затем пришел в Главный госпиталь Массачусетса в Бостоне (MGH). С 1973 года – в Университете Дьюка, параллельно в 1973–1976 году занимал позицию исследователя в американской кардиологической ассоциации, с 1976 года – исследователь в Медицинском институте Ховарда Хьюза. Нынешняя лаборатория Лефковица (Lefkowitz Lab) базируется в Университете Дьюка. В 2007 году удостоен Национальной медали науки (National Medal of Science), вручаемой указом президента США. В том же году удостоен «азиатского Нобеля» – премии Шоу (Shaw Prize).

Брайан Кобилка (Brian Kobilka) родился в 1955 году в штате Миннесота в семье с немецко-польскими корнями. Получил степень бакалавра по биологии и химии в Миннесотском университете, затем степень доктора медицины (MD) на медицинском факультете Йельского университета. Прошел интернатуру в Вашингтонском университете и поступил работать постдоком к Лефковицу. С 1987 по 2003 год – исследователь в Медицинском институте Ховарда Хьюза. Нынешняя лаборатория Кобилки (Kobilka Lab) – в Стэнфордском университете. В 2007 году журнал *Science* назвал его исследования структуры серпентинов одним из прорывов года.

Роберт Лефковиц и Брайан Кобилка в 2012 году стали лауреатами Нобелевской премии по химии «за раскрытие подробной схемы того, как работают рецепторы, связанные с G-белком» (G-protein-coupled receptors, GPCRs или ГТФ-связывающие рецепторы). К этому семейству относятся рецепторы адреналина (также известного как эпинефрин), дофамина, серотонина, света, вкуса и запахов. Большинство



Роберт Лефковиц
(Robert Joseph Lefkowitz)

Брайан Кобилка
(Brian Kobilka)

физиологических процессов зависит от рецепторов этого семейства. Через них действует на нас около половины всех лекарственных препаратов, среди которых β -блокаторы, антигистаминные препараты и различные психотропные средства. Таким образом, информация о рецепторах семейства GPCR, чрезвычайно полезна для человечества. Однако эти рецепторы долгое время ускользали от исследователей.

В конце XIX века, когда ученые начали экспериментировать с эффектами адреналина на организм, они обнаружили, что это вещество заставляет сердце биться чаще, артериальное давление – возрастать, а зрачки – расширяться. Чтобы проверить предположение о действии адреналина посредством нервных волокон, ученые искусственно парализовали нервную систему лабораторных животных. Однако эффект адреналина сохранялся. Ученые пришли к выводу: у клеток должны быть какие-то рецепторы, которые позволяют им чувствовать химические вещества – гормоны, яды или лекарства – в своем окружении. Но когда исследователи попытались обнаружить эти рецепторы, они натолкнулись на преграду. Захотелось понять, как рецепторы выглядят и как они передают сигнал внутрь клетки. Адреналин ведь применялся снаружи клетки, но это приводило к изменению в метаболизме внутри нее. Каждая клетка имеет оболочку – мембрану из молекул липидов, которая отделяет клетку от внешней среды. Как же проникает сигнал сквозь оболочку? Как может содержимое клетки знать о происходящем снаружи? Рецепторы не удавалось обнаружить в течение десятилетий, но, несмотря на это, ученые умудри-

лись создать препараты, которые оказывали свое воздействие специфически через тот или иной тип рецепторов.

В 1940 годах американский ученый Раймонд Олквист изучал, как различные органы реагируют на вещества, схожие с адреналином. Результаты работы натолкнули его на мысль о том, что должно быть два типа рецепторов адреналина: первый главным образом заставляет сокращаться клетки гладких мышц в стенках кровеносных сосудов, а второй – стимулирует сердце. Он дал этим рецепторам названия α и β . Вскоре после этого ученые разработали первые β -блокаторы, которые сейчас являются одними из наиболее часто употребляемых сердечных препаратов. Эти вещества, несомненно, оказывали действие на клетки, но как – оставалось тайной. Теперь мы знаем, почему рецепторы было так трудно обнаружить: они довольно немногочисленны и в основном находятся в клеточной мембране. Спустя пару десятилетий даже Олквист стал остывать к своей теории о двух типах рецепторов. Он писал: «Для меня они являются абстрактной концепцией, позволившей объяснить отклик тканей, который наблюдался у них при действии препаратов различного строения». Именно в этот момент, в конце 1960-х, в истории этих рецепторов появился Роберт Лефковиц, один из Нобелевских лауреатов этого года.

Исследования Лефковица начались в 1968 году, когда он пришел на позицию исследователя в системе Национальных институтов здоровья (NIH). Его работа была связана с изучением рецептора к адренокортикотропному гормону (АКТГ). Научный руководитель Лефковица собирался использовать в экспериментах радиоактивно меченные лиганды (молекулы, на которых реагирует рецептор): светящаяся молекула, «прилипнув» к рецептору, должна была указать на его положение.

Это был прекрасный план; но реализовать его Лефковицу никак не удавалось. Сейчас мы понимаем, как это трудно: рецепторов мало, и они не «вкопаны» в мембрану, а плавают по ней туда-сюда. Спустя два года бесплодных экспериментов с адренокортикотропным гормоном и рецептором к нему Лефковицу все же удалось добиться некоторых успехов, хотя и не совсем тех, на которые он рассчитывал: он разработал методику очень точного вычисления концентрации исходного гормона в плазме с помощью радиофармацевтика.

После этого Лефковица пригласили работать в Университет Дьюка. Он набрал себе команду и переключил свое внимание с АКТГ на адреналин и его рецепторы. На этой ниве он и сделал свои главные открытия.

Надо отметить, что к тому моменту о рецепторах было известно уже довольно много. Например, в 1960 годах было обнаружено, что действие адреналина на клетки опосредуется особым типом белков – G-белками (они названы так потому, что способны гидролизовать гуанозинтрифосфат – GTP). Иными словами, рецептор каким-то образом связывается с адреналином, что каким-то образом влияет на G-белок, который каким-то образом вызывает в клетке те или иные каскады реакций. Ключевой вопрос тут – каким же образом все это происходит, и вот на этот-то вопрос ответа не было. В научном мире ходили самые разнообразные теории для объяснения работы рецепторов, вплоть до самых невероятных: например, что никакого рецептора нет и что сам адреналин умудряется как-то проникнуть внутрь клетки и изменить ее метаболизм.

И вот Лефковиц и его команда приступили к исследованию адреналиновых рецепторов. На вооружении у них была новая, разработанная Лефковицем методика точного вычисления концентрации гормона, а в данной области исследований знание точной концентрации – это уже половина дела. Долгие годы ученые капали на клетки или клеточные экстракты адреналином или его аналогами; кропотливо измеряли соотношения концентраций различных веществ; подсчитывали термодинамические константы; исследовали взаимодействие белков. (За это время было показано, что адреналиновых рецепторов существует два типа, α и β , и что – более того – каждый из этих типов состоит из нескольких подтипов; команда Лефковица работала преимущественно с β -адренорецепторами). И вот, спустя десятилетия однообразных экспериментов, в 1980 году, исследователям наконец удалось разработать согласующуюся со всеми полученными данными теорию функционирования рецепторов, сопряженных с G-белками. Теория эта (в современном понимании) такова.

В мембране клетки плавают адренорецептор. С внутренней стороны мембраны к нему слабо присоединен (или не присоединен вовсе) G-белок, состоящий из трех субъединиц – α , β и γ – и сцепленный с молекулой гуанозиндифосфата (GDP). Пока на рецептор снаружи не села молекула адреналина, он ведет себя абсолютно мирно и безобидно.

Но стоит рецептору встретиться с адреналином, как в нём начинаются сложные конформационные перестройки, вызывающие вначале крепкое присоединение G-белка, а затем его активацию и отделение. Активация G-белка заключается в том, что в нём от такого потрясения молекула гуанозиндифосфата (GDP) заменяется на молекулу гуанозинтрифосфата (GTP) и он распадается на две части – α -субъединица, соединенная с GTP, плывет в одну сторону, а сцепленные вместе β и γ – в другую. Можно сказать, что, соединившись с лигандом, молекула рецептора вначале притягивает к себе G-белок, а потом отталкивает его так, что этот белок разваливается.

Две получившиеся части белка, встретившись с определенными молекулами (таких молекул множество видов, и они называются вторичными посредниками), вызывают их активацию (или, наоборот, деактивацию, зависит от типа посредника), что, в свою очередь, приводит к тем или иным каскадам реакций, которые соответствующим образом изменяют метаболизм и вообще судьбу клетки. Преимущественно в эти игры играет α -субъединица, но и для $\beta\gamma$ -димера определенная активность тоже показана. Таким образом, присоединение одной маленькой молекулы к одному маленькому рецептору может вызвать гигантские клеточные перестройки.

Эта система очень гибкая: в зависимости от типа вторичного посредника, каскады в клетке могут быть абсолютно разными.

Да, но что же происходит дальше с субъединицами G-белка? Рано или поздно α -субъединица гидролизует GTP до GDP; это «выключает» ее активность, и она «мирится» с $\beta\gamma$ -димером и воссоединяется с ним. После этого целый, неактивный, связанный с GDP G-белок подплывает к какому-нибудь рецептору, к которому испытывает достаточную аффинность и соединяется с ним.

Как правило, этот рецептор уже активирован лигандом (к нему аффинность у G-белка самая высокая), и весь процесс повторяется заново.

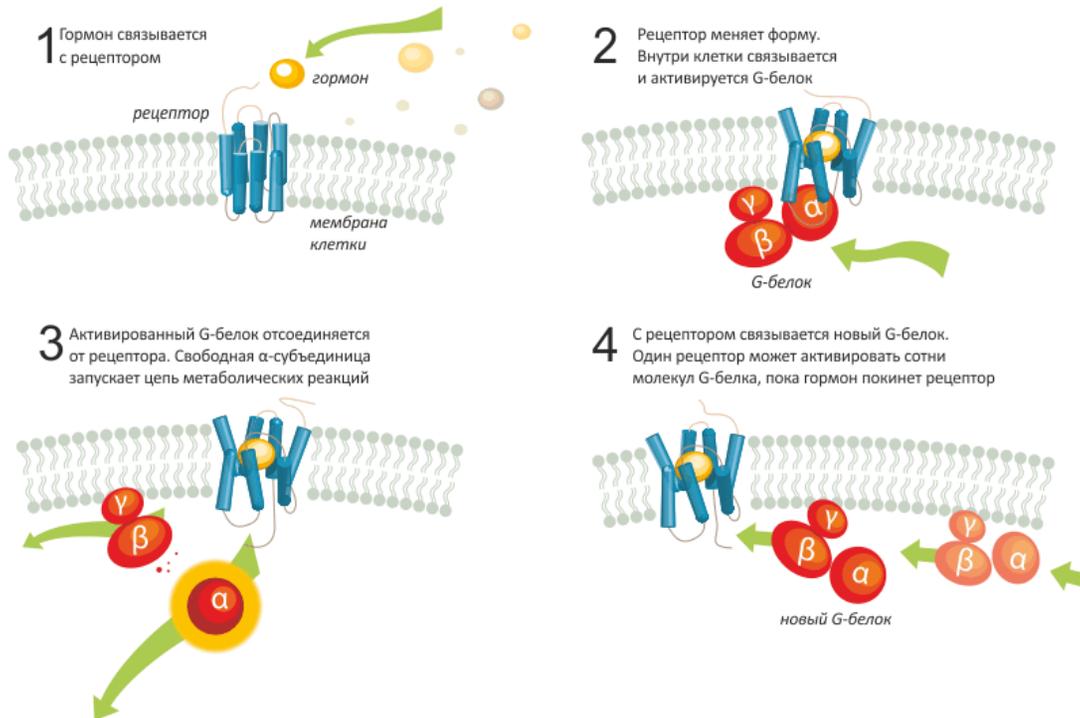


Рис. 1. Когда гормон, «молекула с запахом» или «молекула со вкусом» связываются с рецептором на поверхности клетки, запускается каскад реакций внутри неё.

Это была грандиозная теория. Хотя она объясняла только работу адреналинового рецептора, это было немало. Но это была только половина нынешнего нобелевского открытия. Вторая половина была еще впереди.

В 1970 году Лефковиц публикует статьи в двух престижных журналах *PNAS* и *Science*, в которых описывает открытие активного рецептора. Это достижение дает ему почувствовать волнение исследовательской работы, и в итоге он оказывается в Дьюкском университете в Северной Каролине. Не то чтобы он туда особенно стремился, но там ему сделали предложение, от которого он просто не мог отказаться. В новой лаборатории Лефковиц собирает свою собственную команду исследователей. И хотя уже было ясно, что он никогда не станет кардиологом, он все равно хочет заниматься болезнями сердца.

Итак, он концентрируется на рецепторах адреналина и норадреналина, так называемых адренергических рецепторах. Используя радиоактивно меченные вещества, включая β -блокаторы, его группа изучает работу этих рецепторов, и после прецизионной настройки оборудования удается выделить ряд рецепторов из биологической ткани. Между тем, возросло понимание того, что происходит внутри клетки. Исследователи обнаружили то, что они назвали G-белками (Нобелевская премия по физиологии и медицине за 1994 год) и что активируется по сигналу со стороны рецепторов. В свою очередь, G-белок запускает цепь реакций, которые изменяют метаболизм клетки. С начала 1980-х к ученым стало приходить понимание пути, по которому сигнал передается снаружи клетки вовнутрь (рис. 1).

В 1980 годах Лефковиц решает, что его группе следует попытаться найти ген, который кодирует β -рецептор. Лефковиц поставил перед своими сотрудниками амбициозную задачу найти ген, кодирующий адренорецептор, для того

чтобы получить этот белок в больших количествах, разобраться как следует в его структуре и понять, каким образом он связывается с лигандом, за счет чего «пинает» G-белок и вообще – почему плавает в мембране.

Это решение и привело к получению этой Нобелевской премии. Ген похож на детальный план. Он содержит код, прочитаемый клеткой, когда она соединяет аминокислоты, чтобы получить белок – например, рецептор. Идея состояла в том, что если группе удастся выделить ген β -рецептора, то они смогут получить ключ к механизму его работы. Примерно в то же время Лефковиц приглашает на работу молодого специалиста, Брайна Кобилку. Его увлеченность адренергическими рецепторами началась с увиденного в отделении интенсивной терапии, где доза эпинефрина зачастую становилась гранью между жизнью и смертью. Гормон открывал спавшиеся дыхательные пути и ускорял сердцебиение. Кобилка захотел разобраться в силе эпинефрина до мельчайших молекулярных деталей и поэтому присоединился к Лефковицу и его команде.

Итак, Кобилка включается в охоту за геном. Однако в 1980 годах попытки найти определенный ген в необъятном геноме организма были похожи на поиск иголки в стоге сена. Задача эта была не просто амбициозна – на тот момент развития науки решить ее было практически невозможно. Но Кобилка отличался необыкновенным упрямством, терпением и изобретательностью – у читателя еще будет возможность в этом убедиться. Он (вместе с другими сотрудниками из лаборатории Лефковица) научился выделять этот рецептор в больших количествах, по частям расшифровал его аминокислотную последовательность и уже на основе этой последовательности по кусочкам собрал целый ген и смог его клонировать. Теперь у ученых была нуклеотидная последовательность гена β -адренорецептора, и к тому же

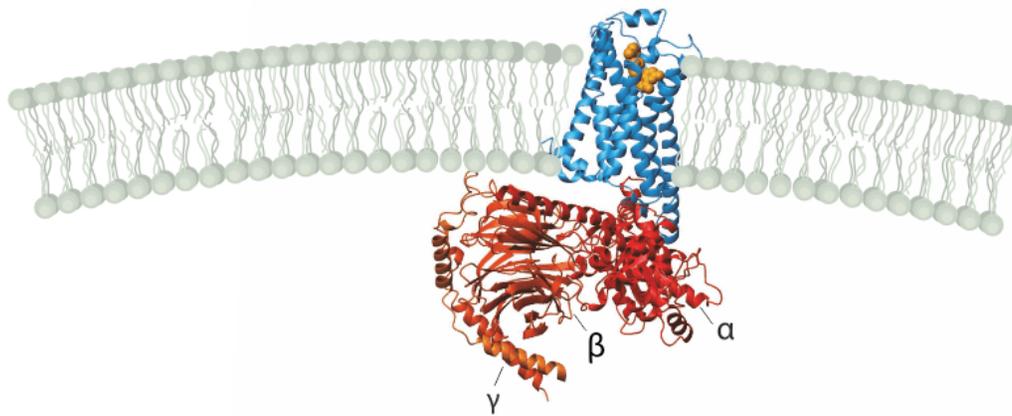


Рис. 2. Кристаллографическая структура активированного β -адренергического рецептора, полученного Кобилкой (показан синим). Гормон (показан оранжевым) присоединяется снаружи, а G-белок (показан красным) связывается изнутри.

они могли путем клонирования получать этот белок в неограниченных количествах.

Кобилка предлагает оригинальную идею, которая делает возможным его идентификацию. Полные надежд, исследователи начинают анализировать генетическую последовательность, из которой следует, что рецептор состоит из семи длинных гидрофобных цепочек – α -спиралей (рис. 2). Это навело на мысль, что рецептор, вероятно, семь раз извивается туда-сюда на своем пути через мембрану клетки. Семь раз. Именно столько цепочек и именно такой формы были выявлены в другом рецепторе, обнаруженном к тому моменту совсем в другом месте организма – рецепторе света родопсине в сетчатке глаза. Возникла мысль: могут ли два эти рецептора быть как-то связаны, несмотря на то, что имеют совершенно разные функции? Позже Роберт Лефковиц скажет, что это была эврика в чистом виде. Он знал, что и адренергический рецептор, и родопсин взаимодействуют с G-белками внутри клетки. Он также знал еще около 30 рецепторов, которые функционируют с участием G-белков.

И оказалось, что белок этот имеет семь трансмембранных доменов.

Семь доменов! Семь! – именно столько, сколько было у совершенно другого, абсолютно несхожего с β -адренорецептором ни по каким статьям, реагирующего на свет рецептора родопсина. Это могло означать потрясающую вещь. Это могло значить, что механизм работы этих двух рецепторов одинаков и описывается моделью тройничного комплекса.

Сложно даже описать, что означал для науки этот прорыв. Очень быстро стало понятно, что по принципу тройничного комплекса работают не только β -адренорецептор и родопсин, но и большая часть других известных к тому моменту рецепторов. (Сейчас таких рецепторов известно около тысячи; они опосредуют общение между клетками; также благодаря им мы видим, слышим, обоняем, осязаем и

ощущаем вкус.) Вывод был таков: должно быть целое семейство рецепторов, которые выглядят и функционируют сходным образом! С момента этого революционного открытия мало-помалу стала складываться вся мозаика, и теперь ученые имеют детальное представление о GPCR – как они работают и как регулируются на молекулярном уровне. Лефковиц и Кобилка оставались на переднем фронте в этом научном путешествии, и в 2011 году Кобилка и его команда сообщила об открытии, увенчивающем их многолетнюю работу. Сразу становилась понятной необычайная гибкость клеток при их реакциях на изменения окружающей среды: ведь один и тот же рецептор, соединенный с одним и тем же лигандом, может вызвать в клетке совершенно разные реакции в зависимости от того, какие именно субъединицы G-белков плавают в цитоплазме (существует множество вариаций этих субъединиц), какой там присутствует набор вторичных посредников, и так далее. Сразу открывались огромные перспективы воздействия на эти рецепторы в исследовательских и медицинских целях (достаточно сказать, что почти половина производимых в настоящее время лекарств так или иначе влияет на эти рецепторы). И сразу хотелось изучать эти рецепторы дальше.

И вот тут огромного успеха снова добился Брайан Кобилка. Он покинул лабораторию Лефковица и перешел работать в Стэнфордский университет. И там, в течение более чем двадцати лет он пытался получить кристаллограмму β -адренорецептора в тот момент, когда он связывается с лигандом. Для всех, кроме Кобилки, эта задача была бы нерешаемой. Дело в том, что техника получения кристаллограмм хорошо отработана только для водорастворимых белков. β -адренорецептор же является жирорастворимым – он ведь должен плавать в фосфолипидной мембране. Кобилка использовал совершенно сногшибательные техники и наконец в прошлом году добился цели: изображение работающего β -адренорецептора было получено.