

osvrti

Nobelova nagrada za kemiju za 2012. godinu

M. Močibob i I. Weygand-Đurašević*

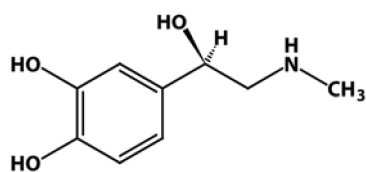
Kemijski odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb

Američki liječnici Robert Lefkowitz i Brian Kobilka, koji su posvetili svoje znanstvene karijere biokemijskim, molekularno-biološkim i strukturnim istraživanjima receptorskih proteina, dobitnici su ovogodišnje Nobelove nagrade za kemiju.

Ljudski genom kodira oko tisuću receptorskih proteina¹ koji prolaze kroz stanične membrane i omogućuju provođenje (transdukciju) signala iz okoliša u stanice. Stanice imaju izraženu sposobnost reagiranja na određene spojeve iz svoje okoline: kao odgovor na njihovu prisutnost prilagođavaju svoj metabolizam ili mijenjaju obrazac ekspresije gena. Kod višestaničnih organizama takvi kemijski signali imaju ključnu ulogu u usklađivanju fizioloških odgovora. Razni hormoni (poput adrenalina, slika 1), neurotransmitori (primjerice serotonin), odoransi (tvari koje potiču osjet mirisa), gustansi (tvari koje potiču osjet okusa), vežu se na receptorske molekule, mijenjaju njihovu konformaciju, a time i interakciju s unutarstaničnim proteinima, koji signal amplificiraju i tako potiču niz biokemijskih procesa (slika 2). Lefkowitzu i Kobilki dodijeljeno je ovo veliko priznanje ponajprije za temeljna otkrića načina djelovanja i građe receptorskih proteina (tzv. adrenergičnih receptora) i njihovih kompleksa s drugim proteinima koji sudjeluju u adrenalinskoj signalizaciji. Ovoj je Nobelovoj nagradi prethodilo pet Nobelovih nagrada iz fiziologije i medicine u sličnom području istraživanja.

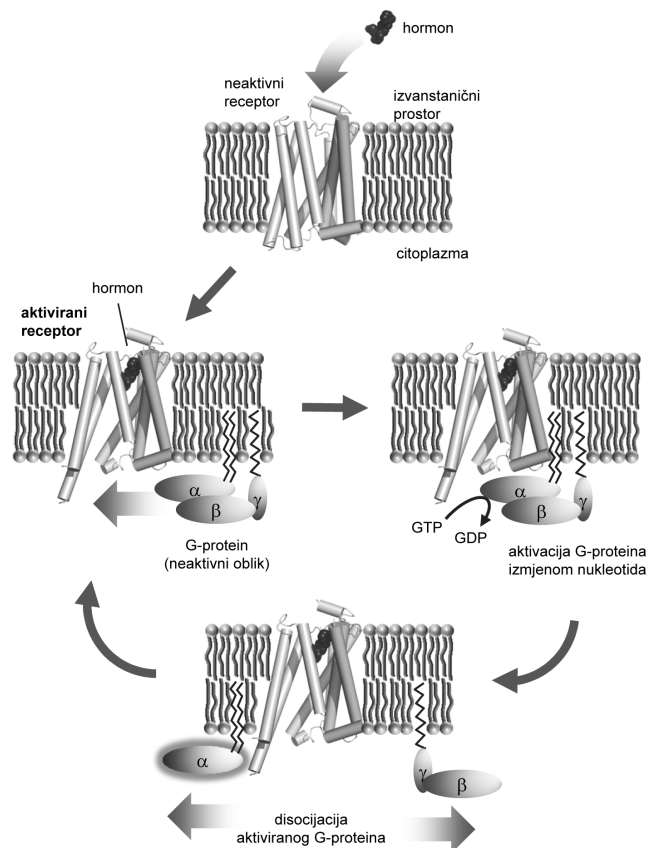
Provođenje ili transdukcija signala zbiva se u nekoliko faza,² od kojih su neke prikazane na slici 2. Podražaj (poput ozljede, straha, probavljenog obroka itd.) potiče otpuštanje signalne molekule za koju je uobičajen naziv *prvi glasnik*. Prvi glasnik može biti hormon, primjerice adrenalin. Većina signalnih molekula ne ulazi u stanice. Umjesto toga vežu se na specifične proteine u staničnoj membrani, *receptore*. Receptori premošćuju staničnu membranu i sadržavaju izvanstanične, membranske i unutarstanične regije. Vezna mjesta za signalne molekule (koje se još nazivaju *ligandi* ili *agonisti*) na izvanstaničnom dijelu receptora analogna su aktivnim mjestima enzima, no nisu katalitički aktivna. Interakcija signalne molekule s receptorom ponešto mijenja prostornu građu receptorskoga proteina, uključujući i njegove unutarstanične dijelove.

Vežanjem signalne molekule i promjenom konformacije takav je receptor aktiviran. Za daljnji prijenos poruke s kompleksa recep-



Slika 1 – Adrenalin

tor–ligand (agonist) služe male molekule, koje nazivamo *drugim glasnicima*. Drugi su glasnici unutarstanične molekule čija se koncentracija mijenja ovisno o okolišnim signalima. Neki od posebno važnih drugih glasnika jesu ciklički AMP (cAMP), ciklički GMP, kalcijevi ioni, itd. Stvaranje drugih glasnika omogućuje višestruko pojačanje signala. Naime, izravnim vezanjem signalnih molekula moguće je potaknuti samo manji broj receptorskih proteina, no svaki aktivirani receptor potiče nastanak mnogih molekula drugoga glasnika. Na taj način niska koncentracija signalne molekule u okolišu, čak i jedna jedina molekula, može izazvati snažan unutarstanični signal i posljedičan odgovor. U adrenalinskoj signalizaciji transmembranski receptor (tzv. adrenergični receptor, slika 3) stvara interakciju s adrenalinskim ligandom (agonistom), a potom s heterotrimernim proteinima (sastavljenim od podjedinica α , β i γ) koji vežu gvanilne nukleotide (pa se stoga zovu G-proteini). Interakcija G-proteina s aktiviranim receptorom potiče izmjenu vezanog gvanozin-difosfata (GDP) gvanozin-trifosfatom (GTP), poslije čega će uslijediti disocijacija heterotrimer na podjedinice

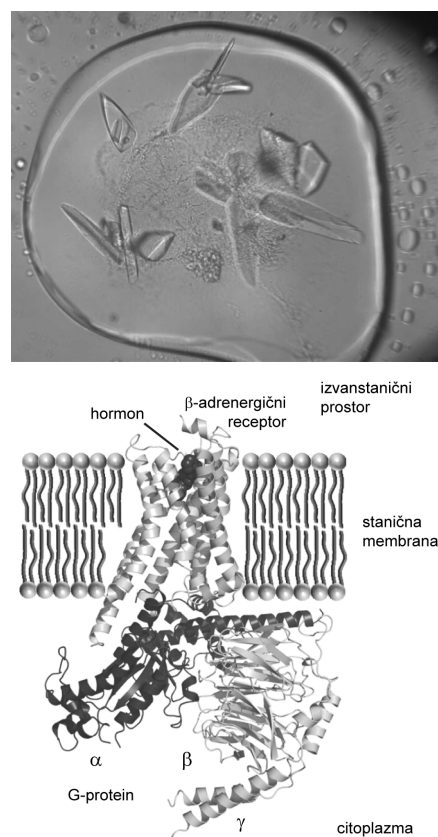


Slika 2 – Provođenje signala: shema aktivacije transmembranskih receptorskih proteina i G-proteina. Vežanje hormona na izvanstaničnoj strani receptora dovodi do konformacijske promjene na citoplazmatskoj strani receptora. Promjena konformacije receptora omogućuje vezanje heterotrimernog G-proteina i potiče izmjenu GDP-a vezanog u α -podjedinici G-proteina GTP-om. Aktivirani G-protein disocira na α -podjedinicu u kompleksu s GTP-om i $G\beta\gamma$ -podkompleks. Receptor može aktivirati nekoliko stotina molekula G-proteina prije nego što hormon s vanjske strane disocira.

* Autor za dopisivanje: prof. dr. sc. Ivana Weygand-Đurašević, e-pošta: weygand@chem.pmf.hr

(slika 3B). Tim se događajem zapravo prenosi u stanicu poruku o vezanju izvanstaničnog liganda na receptor. Važno je i da jedan kompleks hormon–receptor može potaknuti zamjenu nukleotida u velikom broju G-proteinskih heterotrimeričkih podjedinica G_α u kompleksu s GTP-om stvara interakcije s drugim staničnim proteinima (primjerice s enzimom adenilat-ciklazom). Djelovanjem tog ili drugih analognih enzima nastaju drugi glasnici i signal će se provoditi dalje. Konačan učinak signalnog puta jest aktivacija izvršitelja koji izravno mijenjaju stanični odgovor, odnosno poticanje (ili utišavanje) crpki, enzima i transkripcijskih faktora koji izravno nadziru metaboličke putove, aktivaciju gena i procese poput prijenosa živčanih podražaja. U adrenalinskoj signalizaciji stvoreni drugi glasnik (cAMP) aktivirat će protein-kinaze i tako potaknuti kaskadu fosforilacijskih reakcija. Neke će od njih djelovati stimulatивно na biokemijske procese, a druge inhibitory. Nakon svršetka staničnog odgovora signalni se proces mora prekinuti kako bi stanica mogla odgovoriti na novi signal. Osim toga, signalni proces koji nije završen kako valja može izazvati ozbiljne, neželjene posljedice. Primjerice, mnogi slučajevi nastanka raka vezani su uz procese provođenja signala kod kojih je došlo do nepravilnosti u gašenju signala. Signal potaknut adrenalinom prekida se na sljedeći način: G-proteini se spontano vraćaju u neaktivno stanje hidrolizom GTP-a, jer podjedinice G_α imaju inherentnu GTP-aznu aktivnost (kojom se vezani GTP hidrolizira u GDP i P). Ta je reakcija spora i treba nekoliko sekundi ili čak minuta da se G_α iz GTP-oblika, u kojem aktivira nizvodne sudionike puta provođenja signala, prevede u GDP-oblik i ponovno se spoji s $G_{\beta\gamma}$ u neaktivni heterotrimerični protein. U desenzitizaciji receptora sudjeluju i novootkriveni proteini arestini.

Iz impozantnog znanstvenog opusa ovogodišnjih laureata vjerojatno bi se sljedeći rezultati mogli izdvojiti kao najvažniji: 1) Modelom trojnog kompleksa, koji formiraju ekstracelularni ligand (tj. agonist ili prvi glasnik), transmembranski receptorski protein i intracelularni G-protein,^{3,4} Lefkowitz i suradnici objašnjavaju opći mehanizam aktivacije receptora. Postaje jasno da su transmembranski proteinski receptori (najčešće!) spregnuti s G-proteinima, pa stoga dobivaju naziv GPCR (GPCR, engl. *G-protein-coupled receptors*). Tijekom svojih ranih istraživanja Lefkowitz je pokazao da radioaktivno obilježen ligand ne ulazi u stanicu, nego vezanjem izaziva konformacijsku promjenu u receptoru, pa on stoga bolje interagira s G-proteinom, koji će pak dalje prenositi signal na druge unutarstanične proteine. Uočio je također da je taj proces ovisan o GTP-u i da interakcija G-proteina s receptorom potiče izmjenu gvanilnih nukleotida. Stvaranju klasične receptorske teorije pomogle su ranije studije nastanka cAMP-a⁵ (Nobelova nagrada Earlu W. Sutherlandu 1971. godine) i istraživanja strukture i funkcije heterotrimeričnih G-proteina^{6,7,8} (za koja su poslije, 1994. godine, Martin Rodbell i Alfred G. Gillman također podijelili Nobelovu nagradu). 2) Sredinom osamdesetih godina postdoktorand Brian Kobilka uspijeva u Lefkowitzovu laboratoriju na Sveučilištu Duke klonirati i sekvencionirati gen za β_2 -adrenergični receptor, koristeći se pri tome teško dostupnim i stoga mukotrpno izoliranim receptorskim proteinom⁹. Najfascinantniji rezultat tog velikog posla je informacija da primarna i predviđena sekundarna struktura nalikuje ranije sekvencioniranom transmembranskom receptoru rodopsinu, a upečatljivo svojstvo tih proteina je da njihov polipeptidni lanac sedam puta vijuga kroz staničnu membranu, tvoreći sedam transmembranskih zavojnica. Kasnije će se pokazati da mnogi drugi receptori također pripadaju širokoj porodici 7TM-receptora¹⁰ (engl. *seven-transmembrane-helix-receptors*, *7TM receptors*); 3) Lefkowitzeva grupa otkriva da β -adrenergični receptori mogu stvarati interakcije s β -arestinima, te da je transdukcija signala moguća i putem G-proteina i preko β -arestina,^{11,12} 4) Nakon dvadeset godina kristalografskih napora, Kobilkin tim na Sveučilištu Stanford uspijeva 2007. godine rendgenskom strukturnom analizom odrediti prostornu strukturu β_2 -adrenergičnog receptora,^{13,14,15} a potom 2011. godine i njegovu trojnog kompleksa s agonistom i G-proteinom¹⁶ (slika 3). U posljednjih godinu dana riješeno je još nekoliko 3D-struktura ostalih receptora – neke su proizašle i iz Kobilkina laboratorija.



Slika 3 – (A) Kristali β_2 -adrenergičnog receptora, u kompleksu s heterotrimeričnim G-proteinom, nano-antitijelom Nb35 i analogom adrenalina. Kristalizacija receptora u kompleksu s G-proteinom rezultat je višegodišnjeg mukotrpnog truda, te primjene novih i raznovrsnih metoda za poticanje kristalizacije membranskih proteina: receptor je proteinskim inženjeringom modificiran radi lakšeg pročišćavanja, dodatno mutiran i fuzioniran s T4-lizozimom radi lakše kristalizacije, kompleks s G-proteinom priređen je u nedavno razvijenom detergentu koji dodatno stabilizira kompleks, a fleksibilnost G-proteina smanjena je vezanjem posebno dizajniranog nano-antitijela Nb35. Kompleks je tretiran apirazom radi enzimske razgradnje GDP-a oslobođenog prilikom nastajanja kompleksa i kristaliziran je iz lipidne kubične mezofaze. Nakon ispitivanja kvalitete difrakcije stotina kristala, konačni podaci za rješavanje strukture prikupljeni su difrakcijom na 20 kristala koji su najsnažnije difraktilni rendgenske zrake. Preuzeto iz S. G. F. Rasmussen et al., *Nature* **477** (2011) 549–555.

(B) Kristalna struktura β_2 -adrenergičnog receptora, u kompleksu s G-proteinom i analogom adrenalina na izvanstaničnoj strani receptora. Hormon je prikazan u kalotnom obliku, tamnijom nijansom sive boje. G-protein je heterotrimer sastavljen od α -, β - i γ -podjedinice. α -Podjedinica koja pokazuje GTP-aznu aktivnost i koja je u direktnom kontaktu s receptorom istaknuta je tamnijom nijansom sive boje. PDB kôd: 3sn6; S. G. F. Rasmussen et al., *Nature* **477** (2011) 549–555.

Zahvaljujući Lefkowitzu i Kobilki i mnogim drugim istraživačima, među kojima su i dobitnici još pet ranije dodijeljenih Nobelovih nagrada za fiziologiju i medicinu, naše današnje poimanje transmembranske signalizacije je u pravom smislu strukturno-funkcionalno. Mnogi hormoni i neurotransmitori mogu aktivirati više od jednog receptora. Npr. postoji 9 adrenergičnih receptora koji odgovaraju na vezanje adrenalina ili noradrenalina, 13 serotoninskih... itd. Receptori su prilično fleksibilni proteini, što i jest glavni uzrok njihova otežanog strukturnog istraživanja. Vezanje agonista stabilizira konformaciju receptora koja veže i aktivira protein G ili druge signalne makromolekule poput arestina. Lefkowitz i Kobilka već najavljuju novi, ovaj put zajednički (iako nisu izravno

suradivali posljednjih 25 godina) projekt kristalizacije i određivanja prostorne strukture adrenergičnog receptora u kompleksu s arestinom.

Zanimljivo je da su GPC-receptori, kakvih je danas opisano nekoliko tisuća, ciljne molekule gotovo polovice svih postojećih lijekova, a neki od njih, poput popularnog beta-blokatora propranolola, koji smiruje srce pri adrenalinskom stresu, počeli su se upotrebljavati prije pola stoljeća, dakle svakako prije dostupnih strukturnih informacija o njihovim receptorima (Nobelova nagrada Jamesu W. Blacku, 1988. godine).

Jasno je da je istraživanje provođenja signala od velike važnosti za razumijevanje funkcije organizma i za dizajniranje lijekova. Kom-

plicirano je i intrigantno. Privuklo je do sada niz najboljih istraživačkih grupa i okrunjeno je s nekoliko Nobelovih nagrada – ovo je prva za kemiju, jer glavni je rezultat razumijevanje funkcije složenog makromolekulskog kompleksa, čije postojanje je najprije trebalo biokemijski dokazati, uočiti da je dinamičan, gibljiv, da prenosi signal alosteričkim mehanizmom. Vrhunac svega je odgo-netavanje načina interakcija molekula u trojnom kompleksu, i to do atomskih detalja, na temelju rendgenske strukturne analize. I za kloniranje i sekvencioniranje gena adrenergičnog receptora, koje je rađeno desetak godina prije masovnih sekvencioniranja genoma, i za kristalizaciju i strukturnu analizu receptorskog proteina i njegovih kompleksa, primijenjene su vrhunske tehnike i prevladavani mnogi eksperimentalni problemi (slika 3A).



ROBERT J. LEFKOWITZ rođen je 1943. godine u New Yorku (SAD). Školovao se za doktora medicine i diplomirao je na *Columbia University* (New York, SAD) 1966. godine, s ambicijom da postane kardiolog. Nakon jednogodišnjeg stažiranja, 1968. postaje klinički i znanstveni suradnik pri *National Institutes of Health*, i započinje istraživanja na hormonskim receptorima. Od 1973. godine boravi na *Duke University* (Durham, North Carolina, SAD), gdje je postao profesor medicine i profesor biokemije, a od 1976. istraživač

je i prestižnog *Howard Hughes Medical Institute*. Osim Nobelove nagrade, dobitnik je brojnih priznanja i nagrada, osim ostalih, medalje "Jessie Stevenson Kovalenko" američke Nacionalne akademije znanosti (2001.), za važne doprinose medicinskim znanostima, međunarodne nagrade *The Shaw Prize* (2007.) za područje biomedicine i Nacionalne medalje za znanost (2007.) za izvanredan doprinos razvoju bioloških znanosti. Član je američke Nacionalne akademije znanosti od 1988. godine



BRIAN K. KOBILKA rođen je 1955. godine u malom gradu Little Falls u Minnesoti (SAD). Studirao je biologiju i kemiju na *University of Minnesota Duluth*, i poput R. J. Lefkowitz, diplomirao je medicinu 1981. godine na *Yale University School of Medicine*. Godine 1984. pridružio se kao postdoktorant laboratoriju dr. Lefkowitza na *Duke University*, gdje je odigrao presudnu ulogu u kloniranju i određivanju nukleotidnog slijeda gena za β_2 adrenergični receptor. Godine 1989. odlazi na *Stanford University* (Stanford,

Kalifornija, SAD), gdje je danas profesor i pročelnik Odsjeka za molekularnu i staničnu fiziologiju pri *Stanford University School of Medicine*. Član je američke Nacionalne akademije znanosti od 2011. godine.

(Slike preuzete s http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2012/ 5. studenog 2012)

Literatura:

1. S. Takeda, S. Kadowaki, T. Haga, H. Takaesu, S. Mitaku, Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence, *FEBS Lett.* **520** (2002) 97–101.
2. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 6th Ed., W. H. Freeman and Company, New York 2007, str. 381–389.
3. A. De Lean, J. M. Stadel, R. L. Lefkowitz, A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties and the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor, *J. Biol. Chem.* **255** (1980) 7108–7117.
4. L. E. Limbird, D. M. Gill, R. L. Lefkowitz, Agonist-promoted coupling of the beta-adrenergic receptor with the guanine nucleotide regulatory protein of the adenylate cyclase system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77** (1980) 775–779.
5. T. W. Rall, E. W. Sutherland, Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles, *J. Biol. Chem.* **232** (1958) 1065–1076.
6. M. Rodbell, L. Birnbaumer, S. L. Posh, H. M. Krans, The glucagon-sensitive adenylyl-cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanyl-nucleotides in glucagon action, *J. Biol. Chem.* **246** (1971) 1877–1882.
7. E. M. Ross, A. G. Gilman, Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity, *J. Biol. Chem.* **252** (1977) 6966–6969.
8. A. G. Gilman, G proteins: transducers of receptor-generated signals, *Annu. Rev. Biochem.* **56** (1987) 615–649.
9. R. A. F. Dixon, B. K. Kobilka, D. J. Strader, J. L. Benovic, H. G. Dohlman, T. Frielle, M. A. Bolanowski, C. D. Bennett, E. Rands, R. E. Diehl, R. A. Mumford, E. E. Slater, I. S. Sigal, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, C. D. Strader, Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin, *Nature* **321** (1986) 75–79.
10. R. J. Lefkowitz, Seven-transmembrane receptors: something old, something new, *Acta. Physiol.* **190** (2007) 9–19.
11. R. J. Lefkowitz, S. K. Shenoy, Transduction of Receptor Signals by β -Arrestins, *Science* **308** (2005) 512–517.
12. H. Wei, S. Ahn, S. K. Shenoy, S. S. Karnik, L. Hunyady, L. M. Luttrell, R. J. Lefkowitz, Independent β -arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100** (2003) 10782–10787.
13. S. G. Rasmussen, H. Choi, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. C. Edwards, M. Burghammer, V. R. P. Ratnala, R. Sanishvili, R. F. Fischetti, G. F. X. Schertler, W. I. Weis, B. K. Kobilka, Crystal structure of the human β_2 adrenergic G-protein coupled receptor, *Nature* **450** (2007) 383–387.
14. V. Chezerov, D. M. Rosenbaum, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. Choi, P. Kuhn, W. I. Weis, B. K. Kobilka, R. C. Stevens, High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 adrenergic G-protein coupled receptor, *Science* **318** (2007) 1258–1265.
15. D. M. Rosenbaum, V. Chezerov, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. J. Choi, X. J. Yao, W. I. Weis, R. C. Stevens, B. K. Kobilka, R. C. Stevens, GPCR engineering yields high-resolution structural insights into β_2 adrenergic receptor function, *Science* **318** (2007) 1266–1273.
16. S. G. F. Rasmussen, B. T. DeVree, Y. Zou, A. C. Kruse, K. Y. Chung, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. S. Chae, E. Pardon, D. Calinski, J. M. Mathiesen, S. T. A. Shah, J. A. Lyons, M. Caffrey, S. H. Gellman, J. Steyaert, G. Skiniotis, W. I. Weis, R. K. Sunahara, B. K. Kobilka, Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex, *Nature* **477** (2011) 549–555.