

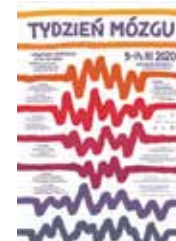
47. Schain AJ, Melo–Carrillo A, Strassman AM, Burstein R. (2017) Cortical Spreading Depression Closes Paravascular Space and Impairs Glymphatic Flow: Implications for Migraine Headache. *J.Neurosci.*; 37:2904–2915
48. Verkhratsky A, Ho MS, Vardjan N, Zorec R, Parpura V. (2019) General Pathophysiology of Astroglia. *Adv. Exp.Med.Biol.*; 1175:149–179
49. Wostyn P, Van DD, Audenaert K, Killer HE, De Deyn PP, De G, V. (2015) A new glaucoma hypothesis: a role of glymphatic system dysfunction. *Fluids Barriers.CNS.*; 12:16
50. Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, O’Donnell J, Christensen DJ, Nicholson C, Iliff JJ, Takano T, Deane R, Nedergaard M. (2013) Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science*; 342:373–377
51. Zou W, Pu T, Feng W, Lu M, Zheng Y, Du R, Xiao M, Hu G. (2019) Blocking meningeal lymphatic drainage aggravates Parkinson’s disease–like pathology in mice overexpressing mutated alpha–synuclein. *Transl.Neurodegener.*; 8:7

Marta Obara-Michlewska. Zakład Neurotoksykologii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk, Warszawa. E-mail: mobara@imdik.pan.pl

RECEPTORY ZWIĄZANE Z BIAŁKAMI G: NAGRODA NOBLA 1971, 1994, 2012

**G protein-coupled receptors:
The Nobel Prize for 1971, 1994, 2012**

Jolanta Barańska (Warszawa)



Streszczenie

Artykuł opisuje historię odkryć naukowych, które poczynając od początku XX w. doprowadziły do wyjaśnienia jak działa i jak jest zbudowany receptor odbierający sygnały od zewnątrzkomórkowych agonistów – hormonów czy neurotransmiterów. Opisuje rolę białek G, pośredników w sprzężeniu między receptorem a enzymem – białkiem efektorowym, przekazującym dalej sygnał do wnętrza komórki. Przybliży także sylwetki naukowe Noblistów uhonorowanych Nagrodą Nobla w latach 1971, 1994, i 2012.

Abstract

The article presents a historical overview on the discovery of G protein–coupled receptors and describes their structure, function and activity. The profiles of researchers honored by the Nobel Prize for 1971, 1994 and 2012 are also presented.

Receptory związane z białkami G (ang. *G Protein-Coupled Receptors, GPCR*) stanowią najliczniejszą rodzinę receptorów błonowych występujących w świecie żywym. W organizmie człowieka koduje je około 1% genów, a ich liczbę szacuje się na blisko tysiąc. Wszystkie charakteryzują się podobną budową – obecnością w cząsteczce siedmiu domen transbłonowych i udziałem białek G w prowadzonych procesach przekazywania sygnałów. Na receptory te

oddziałują nie tylko docierające do komórek hormony czy neurotransmitery, lecz także czynniki chemo-taktyczne, bodźce czuciowe czy sygnały świetlne. Ponadto receptory GPCR są obiektem oddziaływań wielu leków, stąd zainteresowanie współczesnej farmakoterapii i medycyny tym tematem.. Wszystko to czyni zrozumiałymi prestiżowe Nagrody Nobla, które w latach wymienionych w tytule artykułu przyznawano kolejno badaczom zajmującym się wyjaśnianiem

i tłumaczeniem poszczególnych aspektów tej dziedziny wiedzy.

W poniższym artykule przedstawiono jak, poczynając od początków XX wieku, dochodzono do zrozumienia czym jest i jak działa receptor. Opisano jak kształtowała się wiedza dotycząca budowy receptorów GPCR i przekazywania przez nie sygnałów w komórce. Czytelników zainteresowanych tematem autorka odsyła do książek [7,15,16] wydanych przez Polskie Towarzystwo Naukowe (PWN), zajmujących się w szerokim zakresie problematyką przekazywania informacji w komórce zwierzęcej, a także przedstawionych w Bibliografii licznych artykułów przeglądowych, w tym polskojęzycznych [1–4,13].

Nagroda Nobla 1971 – Earl W. Sutherland (1915–1974)

Badania nad receptorami związanymi z białkami G zostały uhonorowane trzema kolejnymi Nagrodami Nobla. Pierwsza z nich, przyznana badaczowi amerykańskiemu E. W. Sutherlandowi, dotyczyła wyników doświadczeń prowadzonych przez niego i jego grupę w latach 50. XX wieku. Opisując jednak historię rozwoju tej dziedziny wiedzy wydaje się konieczne cofnięcie wstecz, do lat przełomu XIX i XX wieku, okresu bogatego w liczne odkrycia naukowe.

Takim niewątpliwym odkryciem było wyodrębnienie z nadnerczy wołu hormonu adrenaliny. Odkrycia tego prawie jednocześnie dokonały dwa zespoły – w 1894 r. G. Oliver i E.A. Schater w Londynie oraz w 1895 r. Napoleon Cybulski i W. Szymanowicz w Krakowie. Napoleon Cybulski był pracownikiem Uniwersytetu Jagiellońskiego a zidentyfikowaną nową „substancję” nazwał „nadnerczyną” [4]. Należy dodać, że nazwa „hormon” została wprowadzona później i po raz pierwszy użyta w roku 1904 dla opisanego sekretyny wydzielanej przez dwunastnicę, stymulującej wypływ soku trawiennego z trzustki. Awięc izolacji i otrzymanie ekstraktów adrenaliny było o 10 lat wcześniejsze. Adrenalina (epinefryna) jest syntetyzowana w komórkach chromochłonnych rdzenia nadnerczy i jest z nich uwalniana po podrażnieniu bodźcami nerwowymi z sympatycznego układu nerwowego. Tak jak inne hormony jest wydzielana do krwi i roznoszona przez nią do wszystkich części ciała. Adrenalina należy do grupy związków klasyfikowanych jako katecholaminy, do grupy tej należy też noradrenalina i dopamina. Adrenalina i noradrenalina to również klasyczne neuroprzekazniki, neurotransmitery wytwarzane w zakończeniu neuronów. Do strumienia krwi adrenalina wydzielana jest w wyniku szoku emocjonalnego – w stanie przestrawu,

zagrożenia czy złości, lecz także gdy poziom cukru we krwi opada poniżej poziomu tolerowanego przez komórki nerwowe. Powoduje to między innymi wzrost ciśnienia krwi, przyśpieszenie tętna serca, zwiększenie poziomu glukozy we krwi, zwężenie tętniczek i blednięcie skóry, czy rozszerzenie źrenic. Wszystko to wiemy obecnie, lecz już wtedy było dla uczonych oczywiste, że związek ten musi oddziaływać na określone struktury w organizmie.

Innym istotnym osiągnięciem tego okresu było wytłumaczenie przez niemieckiego uczonego Emila Fischera na czym polega reakcja enzymatyczna. Fischer w 1894 r. wykazał, że reakcja ta polega na wiązaniu substratu do tzw. miejsca aktywnego znajdującego się w białkowej cząsteczce enzymu i jest wysoce specyficzna. Związanie z miejscem aktywnym powoduje zmianę elektronów w chemicznych wiązaniach substratu i przez to utworzenie nowego związku, produktu reakcji, który opuszcza enzym. Fischer przez analogię porównał po raz pierwszy charakter tego wiązania do współdziałania między zamkiem (enzym) a kluczem (substrat). Porównanie to w przyszłości okazało się prawidłowe, tłumaczące stereospecyficzność enzymów, a ponadto pozwoliło innemu uczonemu, Paulowi Ehrlichowi, na sformułowanie podobnej analogii w przypadku działania leków.

Paul Ehrlich (1854–1915) urodził się w Strzelnie (Dolny Śląsk) i ukończył studia – chemię, a następnie medycynę w Breslau (Wrocław). Po doktoracie w Berlinie, Ehrlich przeniósł się do Frankfurtu nad Menem, gdzie rozpoczął pracę w Instytucie Terapii Eksperymentalnej. Instytut ten zajmował się syntezą i oddziaływaniem leków na organizm i problem ten stał się wiodącym w pracach i rozważaniach Ehrlicha. W owym czasie było już bowiem wiadome, że wszystkie organizmy żywe są zbudowane z komórek, a każda z nich jest otoczona błoną plazmatyczną. Błony plazmatyczne są bardzo cienkie (3–6 nm) i efektywnie nieprzepuszczalne dla jonów i polarnych cząsteczek. I tak np. jony potasu ulegają w roztworze wodnym równomiernej dyfuzji w ciągu około 5 ms, a swobodne przejście przez błonę zajęłoby im około 12 dni. Zatem stopień przepuszczalności błony komórkowej jest zbyt niski, aby hormony czy leki, które są zazwyczaj związkami hydrofilowymi, dobrze rozpuszczalnymi w roztworach wodnych i płynach wewnątrzustrojowych, mogły samoistnie przeniknąć przez błonę plazmatyczną do wnętrza komórki. Wydawało się więc oczywiste, że musi istnieć jakiś inny mechanizm powodujący efektywne działanie tych cząsteczek.

Uczeni zastanawiali się nad tym problemem od lat i już w 1878 r. John N. Langley, badając anta-

gonistyczne działanie atropiny i pilokarpiny na wydzielanie śliny u kota, postulował, że w gruczołach ślinowych muszą znajdować się określone miejsca rozpoznające i tworzące kompleksy z substancjami na nie działającymi. Bogaty w tę wiedzę Paul Ehrlich wprowadził w 1906 r. pojęcie receptora jako miejsca w błonie plazmatycznej komórki, z którym specyficznie łączą się leki. Postulował, że to połączenie zachodzi na zasadzie zamka i klucza (ang. „*Lock and Key theory*”). Teoria zamka i klucza i pojęcie receptora jest aktualne do dziś. Jednak wykazanie, że receptory są strukturami białkowymi, a także wyjaśnienie, na czym polega oddziaływanie z nimi substancji sygnałowych pozostawało tajemnicą do drugiej połowy XX wieku. Należy dodać, że w 1914 r. Ehrlich był wśród tych intelektualistów niemieckich, którzy podpisali list otwarty, tzw. „List 93” protestujący przeciwko militarnej rozbudowie Niemiec i I Wojnie Światowej. List pozostał apelem, a po stosunkowo niedługim czasie wybuchła druga wojna, która, jak wiemy, zrujnowała Europę. Dlatego nie dziwi fakt, że centrum nauki światowej przeniosło się do Stanów Zjednoczonych.

Od czasu wprowadzenia przez Erlicha pojęcia receptora, pojęcie to, choć owiane aurą tajemniczości, istniało w nauce. W latach 30. XX wieku wszyscy wierzyli, że receptory istnieją. Badając działanie agonistów i antagonistów dowodzono teoretycznie ich istnienia i wysuwano różne hipotezy dotyczące ich lokalizacji i działania. Kres hipotezom przyniosły dopiero badania prowadzone w latach 50. XX w. przez badacza amerykańskiego Earla W. Sutherlanda.

Earl W. Sutherland i jego współpracownicy badali wpływ adrenaliny i glukagonu na rozpad glikogenu w komórkach wątroby szczura. Glukagon jest hormonem wydzielanym przez komórki trzustki w odpowiedzi na małe stężenie cukru we krwi. Podobnie jak adrenalina, hormon ten działając na wątrobę powoduje przekształcenie glikogenu do glukozy i wydzielenie tego związku do krwi. Badając homogenaty wątroby szczura w obecności jednego lub drugiego hormonu, Ehrlich stwierdził, że dodanie do prób adenozyntrifosforanu (ATP) powoduje powstanie nowego związku. Oczyszczył go do homogenności i wykazał, że jest to cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan (cAMP), powstający z ATP w wyniku aktywacji i działania specyficznego enzymu, który nazywał cyklazą adenylanową (ang. *adenylate cyclase*) [18]. Tę podręcznikową obecnie reakcję przedstawia rycina 1.

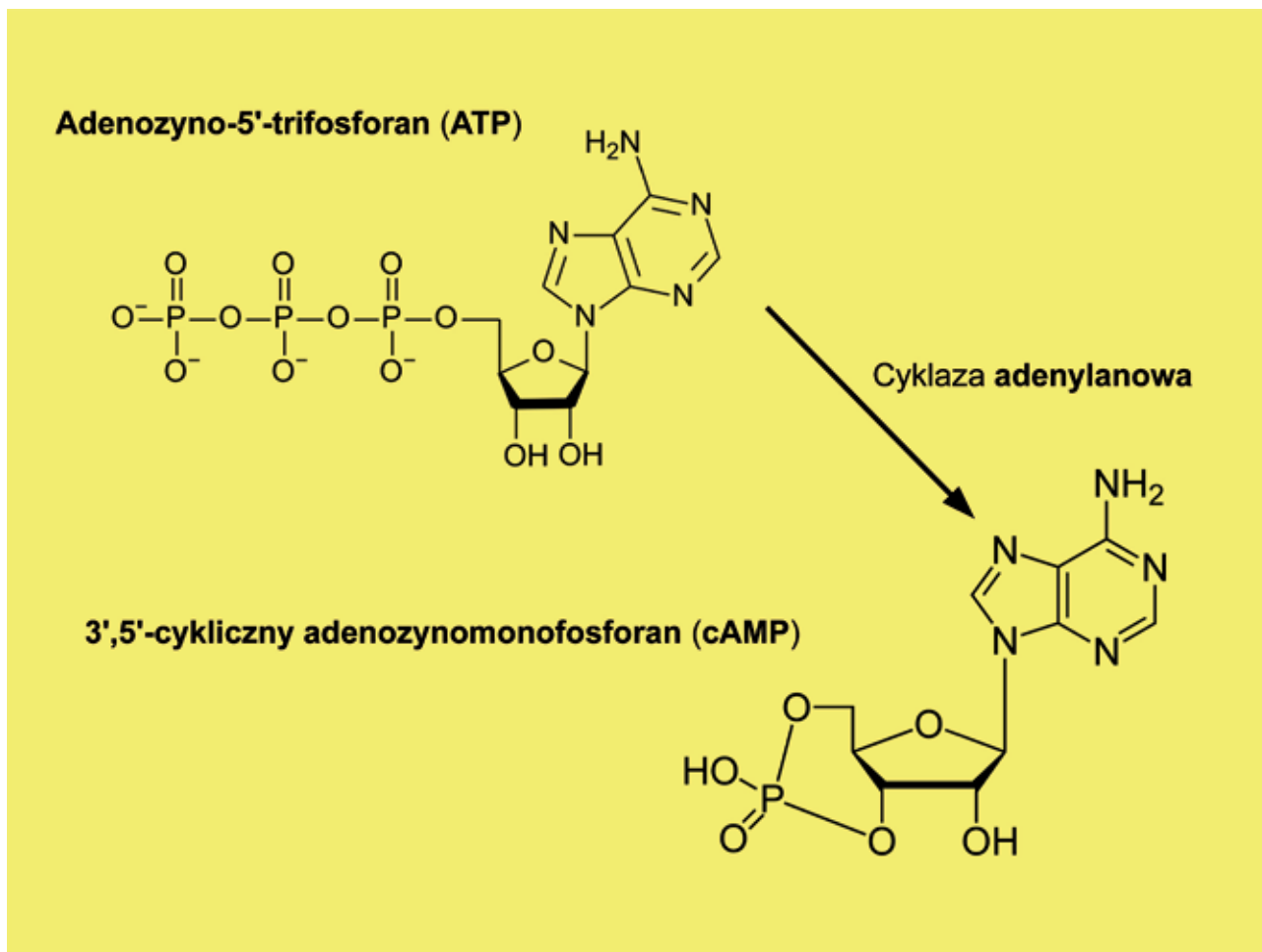
Sutherland izolując cAMP początkowo nie zdawał sobie sprawy z wagi tego odkrycia. Sądził, że nukleotyd ten jest ogniwiem pośrednim w metaboli-

zmie energetycznym w komórce i nie był przekonany o jego roli w przekazywaniu informacji. Odkrycie to wywołało jednak duże zainteresowanie, między innymi Jacquesa L. Monoda, innego amerykańskiego uczonego. Monod był enzymologiem, twórcą teorii allosteryczności, za którą zresztą także otrzymał Nagrodę Nobla w 1965 r. Mówiąc najprościej, teoria ta głosiła, że enzym (białko) zawiera na powierzchni nie tylko domenę katalityczną z miejscem aktywnym wiążącym substrat, lecz również domenę regulatorową [11]. Zgodnie z tą teorią Monod, znając wyniki doświadczeń Sutherlanda, sugerował, że cyklaza adenylanowa będąc enzymem pełni jednocześnie funkcje receptorowe. Przenikając przez błonę plazmatyczną zawiera dwa miejsca wiązania – po zewnętrznej stronie błony miejsce regulatorowe (receptorowe), które wiąże hormon i miejsce katalityczne po stronie wewnętrznej błony plazmatycznej, mające zdolność wiązania ATP i przekształcania go w cAMP. Teoria ta była w owym czasie popularna, ale Sutherland się z nią nie zgadzał. W dalszych pionierskich badaniach grupa Sutherlanda scharakteryzowała układ generujący cAMP i wykazała jego rolę w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Jak wykazał Sutherland, Monod błędnie zakładał tożsamość białka enzymatycznego z receptorem. W pracy przeglądowej z 1966 r. [25] Sutherland omawia swoją teorię tzw. wtórnych przekaźników informacji (ang. *Second Messenger theory*). Według Sutherlanda hormon – agonista, ligand, przekaźnik pierwszego rzędu – wiąże się po stronie zewnętrznej komórki z białkiem receptorowym tworząc z nim kompleks, co wywołuje zmianę konformacyjną struktury przestrzennej w cząsteczce receptora. Zmiana ta powoduje, że receptor staje się zdolny do wiązania po stronie wewnętrznej błony plazmatycznej enzymu, cyklazy adenylanowej, prowadząc do powstania cAMP. Cykliczny AMP (cAMP) jest wtórnym przekaźnikiem informacji, rozpoczyna bowiem kaskadę reakcji aktywując kinazę białkową A i kolejne cząsteczki innych białek, zdolnych do aktywacji określonego genu w jądrze komórkowym.

A zatem Sutherland wykazał, że receptor jest cząsteczką białka przenikającą przez błonę plazmatyczną. Składa się z trzech domen: domeny zewnętrznej, domeny znajdującej się w błonie i domeny wewnętrznej rozciągającej się w cytoplazmie. Hormon docierający do docelowej komórki nie potrzebuje wnikać do jej wnętrza, aby wywołać określoną odpowiedź. **Odkrycie to – wyjaśnienie jak działa hormon – zostało dostrzeżone i uhonorowane przyznaniem Sutherlandowi w roku 1971 Nagrody Nobla z dziedziny fizjologii i medycyny.** Należy dodać, że tak jak nazwa „receptor” jest autorstwa Paula Ehrlicha,

to określenia „first messenger”, „second messenger”, „agonista” czy „przekazywanie informacji” zostały do słownictwa naukowego wprowadzone przez Earla W. Sutherlanda.

jednak zgodnie z teorią Sutherlanda, powinny mieć taką samą domenę – identyczny region katalityczny aktywujący cyklazę adenylanową. Robdell uznał, że ta powszechnie przyjęta sekwencja wydarzeń przy-



Ryc. 1. Schemat reakcji enzymatycznej prowadzonej przez enzym, cyklazę adenylanową, w której ATP w wyniku cyklizacji zostaje przekształcony w cykliczny AMP (cAMP).

Nagroda Nobla 1994 – Martin Robdell (1925–1998) i Alfred G. Gilman (1941–2015)

Wyniki uzyskane przez Sutherlanda miały ogromny wpływ na badania kolejnego amerykańskiego uczonego, Martina Robdella. W latach 60. XX wieku **Martin Robdell** rozpoczął karierę naukową badając tworzenie cAMP w komórkach tłuszczowych. Wykazał, że synteza tego związku zachodzi nie tylko pod wpływem adrenaliny i glukagonu, lecz także sekretyny, hormonu adrenokortykotropowego (ACTH), histaminy i dopaminy. Dodatkowe czynniki, enzymy proteolityczne czy jony wapnia zwiększały lub zmniejszały działanie jednych hormonów nie wpływając na inne. Pozwoliło to Robdellowi stwierdzić, że każdy hormon musi działać na inny receptor, ale wywołuje ten sam skutek. A więc różne receptory muszą mieć różne domeny wiążące różne hormony,

mująca, że receptor działa bezpośrednio na enzym jest mało prawdopodobna i wymaga korekty. W tym przekonaniu utwierdziła go cybernetyka, którą był zafascynowany i którą postanowił wykorzystać do analizy procesów zachodzących w komórce. Zgodnie z tym tokiem myślenia, receptory nazwał dyskryminatorami, a enzymy, których aktywność stymulował hormon, wzmacniaczami, efektorami. Na drodze dedukcji postulował jednak, że pomiędzy nimi powinien znajdować się dodatkowy składnik – przekaźnik (ang. *transducer*), przekazujący sygnał do komórki w następującej sekwencji zdarzeń: hormon – receptor – przekaźnik – enzym.

Jednocześnie (w 1971 r.) Robdell rozpoczął badania nad syntezą cAMP zachodzącą pod wpływem glukagonu w izolowanych błonach plazmatycznych wątroby szczura, będących źródłem receptora i enzymu. Do prób doświadczalnych dodawał ATP –

substrat konieczny do powstania cAMP. Wynik doświadczeń wzbudził jego zdziwienie, bowiem gdy w jednych próbach reakcja zachodziła, w innych nie zachodziła. Po sprawdzeniu okazało się, że próby te różniły się preparatami ATP, produkowanymi przez określoną firmę farmaceutyczną. Rodbell przypuszczał, że reakcja nie zachodzi, gdy preparat ATP jest zanieczyszczony. Zaciekawiony tym, co hamuje reakcję, złożył reklamacje. Wynik okazał się odmienny i w efekcie przyniósł Robdellowi późniejszą Nagrodę Nobla. Okazało się bowiem, że preparaty zawierające oczyszczony do homogenności ATP nie działały, a efektywne były te, w których ATP był częściowo zanieczyszczony domieszką innego nukleotydu, trudno oddzielanego od ATP, nukleotydu guanylowego, guanozynotrifosforanu (GTP). Wynik ten wskazywał na rolę GTP w procesach przekazywania informacji [20] i utrwalał sugestię, że sekwencja zdarzeń w przekazywaniu sygnału jest bardziej skomplikowana niż sądzono [21].

Teoria Robdella głosząca istnienie przekąźnika pomiędzy receptorem a enzymem i wykazanie istotnej roli GTP w tworzeniu cAMP spotkała się jednak z obojętnością, a nawet drwiną środowiska naukowego. Traktowano ją jako hipotetyczną, a uzyskany wynik dotyczący GTP nie uważano za istotny, wprowadzający korektę do teorii Sutherlanda. W artykule przeglądowym opublikowanym w latach późniejszych (1992), Robdell przedstawia swoje dwudziestoletnie badania i opisuje jak niejednokrotnie jego wystąpienia na seminariach spotykały się ze śmiechem, czy nawet ostentacyjnym wychodzeniem z sali [22]. Dopiero prowadzone w latach 80. niezależne badania Alfreda Gilmana (Dallas, Texas) wykazały słuszność przewidywań Robdella i całkowicie potwierdziły zasadność jego rozumowania.

W końcu lat siedemdziesiątych **Alfred G. Gilman** wraz ze współpracownikami badali wpływ temperatury na aktywność cykazy adenylanowej. Do badań używali detergentowe ekstrakty błon plazmatycznych komórek chłoniaka i stwierdzili, że po podgrzaniu do temperatury 37°C aktywność enzymu zniknęła w ciągu 20 min. Jako kontroli używano błon komórek zmutowanych, nieposiadających aktywności cykazy. Na zasadzie przypadku, omyłkowo, do podgrzanych błon pozbawionych aktywności enzymu dodano błony komórek zmutowanych, które jako takie tej zdolności nie posiadały. Wynik pomyłki okazał się zdumiewający, bowiem połączenie obu preparatów przywracało tę zdolność [23]. Obserwowane zjawisko można było jedynie wytłumaczyć zakładając, że za syntezę cAMP odpowiadają dwa białka, termolabilne i termostabilne. Założono, że białko termosta-

bilne znajduje się w błonach komórek podgrzanych, a białko termolabilne zostało uzyskane z komórek zmutowanych. To założenie okazało się słuszne. Białko termostabilne zostało w 1980 r. oczyszczone do homogenności. Wykazano, że wiąże ono GTP i w tej postaci aktywuje cyklazę adenylanową, która okazała się być białkiem termolabilnym [14]. A więc podgrzanie inaktywowało cyklazę, nie działając na aktywność drugiego białka. Z kolei mutacja komórek nie dotyczyła braku cykazy adenylanowej, a owego innego białka. W 1985 r. Gilman i współpracownicy dysponowali już oczyszczonym do homogenności preparatem owego białka, a także oczyszczoną cyklazą adenylanową i receptorem beta-adrenergicznym, którego agonistą jest adrenalina i noradrenalina. Te trzy białka wbudowano w sztuczne błony pęcherzyków liposomalnych, utworzonych ze zmieszanych w określonych proporcjach fosfolipidów. Wewnątrz pęcherzyków zamykano ATP i GTP. Badacze wykazali, że gdy na układ ten działa sygnał, synteza cAMP wymaga obecności wszystkich trzech białek – receptora, odkrytego białka (przekąźnika) i enzymu [10].

Białko przekąźnikowe, wiążące i stymulowane przez GTP, zostało przez Gilmana nazwane białkiem G [10]. Przedstawione wyniki badań Gilmana w pełni udowodniły słuszność i zasadność postulowanej teorii Robdella. **W roku 1994 – za odkrycie białek G – Robdell i Gilman zostali uhonorowani Nagrodą Nobla z dziedziny fizjologii i medycyny.**

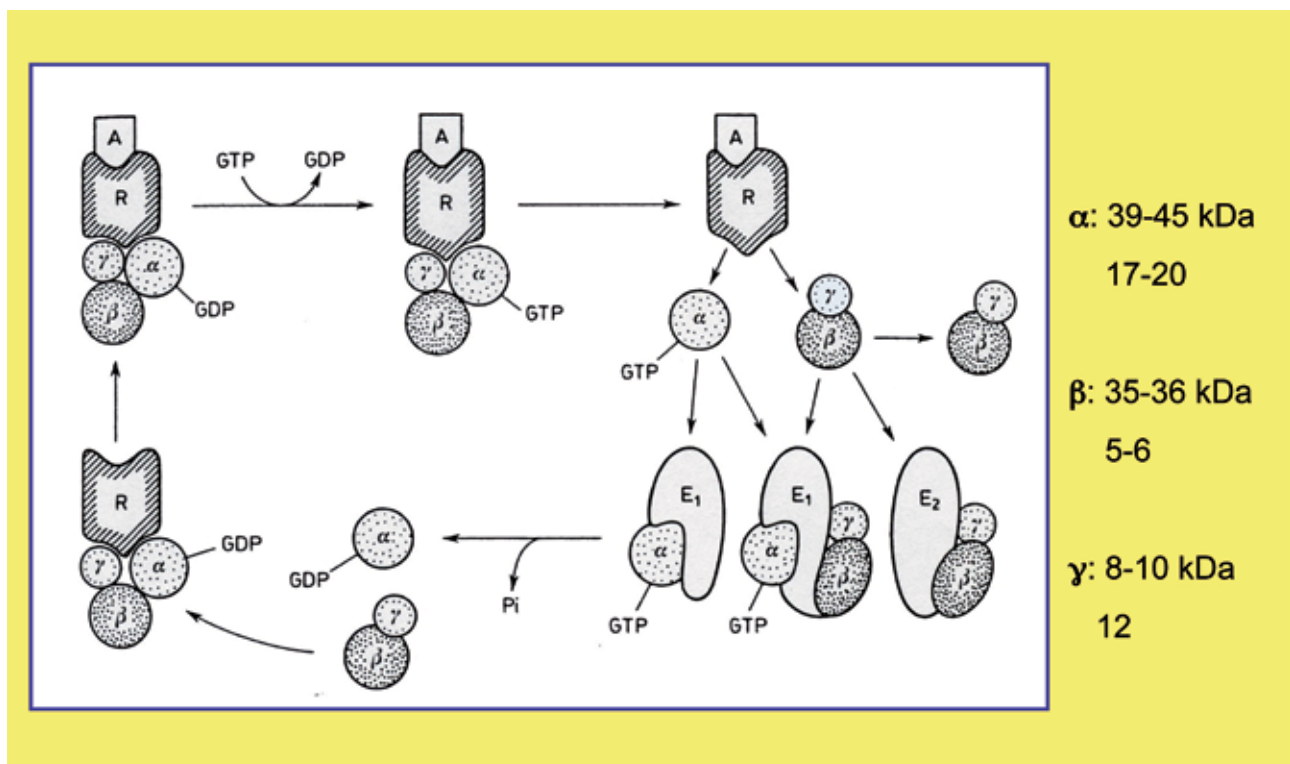
W latach późniejszych dalsze badania Gilmana, Robdella i innych uczonych poszły w kierunku poznania struktury, właściwości i funkcji białek G [1–3]. Badania wykazały, że białka G tworzą rodzinę homologicznych, trójpodjednostkowych białek wiążących GTP. Posiadają także zdolność hydrolizy GTP do GDP, mają więc właściwości enzymu – stałą aktywność GTPazową. Białka G przekazują sygnał od błony plazmatycznej według jednego uniwersalnego schematu – od receptora, poprzez białko G, do efektoru [6]. Na rycinie 2 przedstawiono schematycznie budowę i działanie białek G. Białka G składają się z trzech podjednostek: alfa, beta i gama. Podjednostka alfa ma domenę wiążącą GTP i GDP. Z GDP przylega do pozostałych podjednostek i stanowi formę nieaktywną związaną z receptorem. Gdy na receptor działa agonista, następuje zmiana konformacyjna receptora, przenoszona także na zmianę struktury przestrzennej białka G. Powoduje to uwolnienie GDP i przyłączenie GTP do podjednostki alfa; w takiej postaci białko G staje się aktywne [6]. Podjednostka alfa odłącza się teraz od kompleksu beta/gama i aktywuje określony efektor (E_i). Są doniesienia, że także kompleks beta/gama ma zdolność do takiej aktywacji,

działając na inny efektor (E_2) lub synergistycznie czy przeciwnie na ten sam, na który działa podjednostka alfa (E_1). Aktywność białka G utrzymuje się tak długo, jak długo do podjednostki alfa jest przyłączony GTP. Podjednostka alfa ma zdolność do hydrolizy GTP. W jej wyniku powstaje GDP, co jest sygnałem do ponownego połączenia wszystkich trzech podjednostek i białko G staje się znowu nieaktywne. Należy dla porządku zaznaczyć, że według pewnych doniesień do aktywacji efektora (enzymu) konieczna jest obecność GTP, a odłączenie podjednostki alfa od pozostałych nie jest konieczne.

Wydzielono i sklonowano geny wielu podjednostek białek G. Liczba sklonowanych podjednostek alfa (masa cząsteczkowa 38–45 kDa) waha się w zależności od źródła informacji od 17 do 20, podjednostek beta od 5 do 6, a liczbę podjednostek gamma podaje się jako 12 (ryc. 2). Klasyfikacja białek G opiera się na właściwościach i podobieństwie aminokwasów podjednostki alfa. Zasadniczo wyróżnia

lei białka Gq mają inne działanie – podjednostka alfa tego białka nie działa na cyklazę adenylanową, a aktywuje inny enzym, fosfolipazę C. W efekcie tworzą się wtórne przekaźniki informacji, które wpływają na wzrost poziomu stężenia wolnych jonów wapnia w komórce i aktywację kinazy białkowej C [1,2]. Należy dodać, że w pewnych typach białek G występują w ich podjednostkach alfa specjalne domeny ulegające toksynom bakteryjnym krztuśca (G_i) lub cholery (G_s). Toksyna cholery powoduje blokadę aktywności GTPazowej, co uniemożliwia hydrolizę GTP do GDP. Utrzymująca się stała aktywność cyklazy adenylanowej powoduje nieprzemijający wzrost stężenia cAMP, wywołując uporczywe biegunki będące objawem choroby. Działanie toksyny krztuśca polega na blokowaniu dostępu białka do receptora.

Z kolei białka G12/13 aktywują małe białko G – białko Rho [3]. Należy zaznaczyć, że używając określenia „białko G” myślimy o rodzinie omówionych powyżej trójpodjednostkowych białek pełniących



Ryc. 2. Schemat działania białek G. Opis skrótów patrz tekst. (wg. J. Barańska, 1977).

się 4 główne typy tych białek: G_s , G_i , G_q i G12/13 [6]. G_s to białka, których rola polega na aktywacji cyklazy adenylanowej i zwiększeniu stężenia cAMP. Receptor związany z białkiem G_i nie stymuluje, a hamuje aktywność cyklazy powodując zmniejszenie stężenia cAMP w komórce. W skład białek tej klasy wchodzi także białko G_o , które występuje w mózgu i G_t , występujące w pręcikach siatkówki oka, związane z rodopsyną i aktywowane przez światło. Z ko-

rolę przekaźników w przenoszeniu sygnału od receptorów w błonie plazmatycznej komórki do jej wnętrza. Jednak do nadrodziny białek G należą również tzw. „małe białka G”, które nie tworzą struktur oligomerycznych. Małe białka G, np. Rho, Ras, Rap, Arf-1 występują w postaci monomeru i są odpowiednikami podjednostek alfa białek G. Z tymi ostatnimi łączy je wspólna cecha – ich działanie jest w pełni regulowane przez nukleotydy guanylanowe, GTP – „włączają-

cy” i GDP „wyłączający” system [3]. Małe białka G są aktywowane przez czynniki wzrostu, działające na inną klasę receptorów błonowych niż receptory GPCR. Pośredniczą w sygnałach przedłużonych w czasie, jak mitogeneza czy różnicowanie. W odróżnieniu od małych, monomerycznych białek G, trójpodjednostkowe białka G uczestniczą w szybkich, przemijających odpowiedziach komórki, takich jak aktywacja określonych enzymów, wzrost stężenia jonów wapnia, wzrost lub zmniejszenie stężenia cAMP, czy wreszcie aktywacja kanałów jonowych. Mówiąc najogólniej – ich funkcja to regulacja poziomu wtórnych przekaźników informacji w komórce. Zaktywowanie receptora przez hormon czy neurotransmitter prowadzi więc do powstania wtórnych przekaźników, a te wywołują dalszy sygnał – kaskadę fosforylacji białek w komórce, a po dojściu do jądra komórkowego zmianę aktywności transkrypcyjnej genów kodujących różne białka i w efekcie określoną odpowiedź komórki.

Białka G otrzymują i przekazują sygnały od więcej niż 200 typów receptorów rodziny GPCR. Nagroda Nobla z roku 2012 dotyczy właśnie badań receptorów związanych z białkiem G, receptorów GPCR.

Nagroda Nobla 2012 – Robert J. Lefkowitz (1943-..) i Brian K. Kobilka (1955-..)

Od czasu odkrycia i wyjaśnienia przez Sutherlanda, że działanie hormonów polega na ich łączeniu z białkowymi receptorami znajdującymi się w błonie plazmatycznej komórek docelowych, działanie i budowa tych receptorów znalazły się w centrum uwagi uczonych. Skoro okazało się, że receptory nie są tworam i teoretycznymi, a są realnymi cząsteczkami białka, dla poznania ich struktury i funkcji zaczęto używać wszelkich dostępnych metod technik biochemicznych i biologii molekularnej. Metody elektrofizjologiczne, a szczególnie chromatograficzne, pozwoliły na wyizolowanie i scharakteryzowanie receptorów, jednak dopiero rozwój metod biologii molekularnej, takich jak klonowanie, sekwencjonowanie, czy punktowa mutageneza, pozwoliły na poznanie ich budowy. Pierwszym poznanym receptorem, receptorem należącym do rodziny GPCR, był receptor beta2–adrenergiczny. Zgodnie z obecnie przyjętą klasyfikacją receptory adrenergiczne dzielimy na podtypy: alfa1, alfa2 i beta. Oba podtypy receptorów alfa wykazują większe powinowactwo do noradrenaliny, podczas gdy receptory beta do adrenaliny. Ponadto receptory adrenergiczne typu alfa1 są związane z białkiem Gq i odpowiadają za zwiększenie stężenia wolnych jonów wapnia, a receptory alfa2, związane

z białkiem Gi, hamują aktywność cykazy adenylowej i zmniejszają stężenie cAMP w komórce. Z kolei receptory podtypu beta są związane z białkiem Gs i odwrotnie niż alfa2, aktywują cyklazę i odpowiadają za zwiększenie stężenia cAMP w komórce. Istniejące w ramach poszczególnych podtypów pewne różnice strukturalne między należącymi do nich receptorami spowodowały dalszy podział. I tak podtyp beta dzielimy na receptory adrenergiczne beta1, beta2 i beta3 [13]. Poznanie i szczegółowa charakterystyka receptora beta2–adrenergicznego, należącego do wielkiej rodziny receptorów GPCR, jest niewątpliwą zasługą Roberta J. Lefkowitza i Briana K. Kobilki.

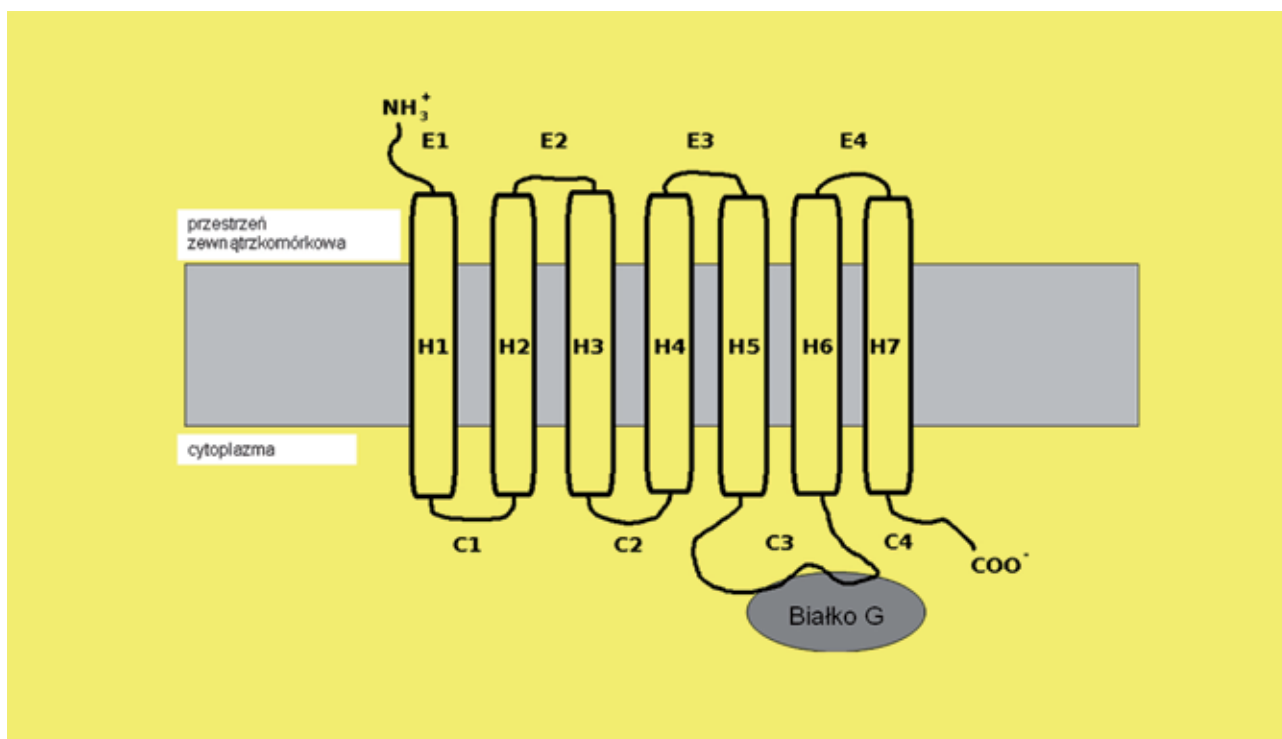
Robert J. Lefkowitz i Brian K. Kobilka to uczeni amerykańscy, ale, co należy zaznaczyć, obaj z polskimi korzeniami. Lefkowitz ukończył medycynę na Columbia University, odbył rezydenturę na Uniwersytecie Harvarda, a następnie rozpoczął pracę w Howard Hughes Medical Institute w Duke University w Karolinie Północnej. Już w latach 70. zajął się wyjaśnieniem budowy receptorów alfa i beta adrenergicznych [24]. Kobilka po ukończeniu medycyny na Yale University i rezydenturze na Uniwersytecie w St. Louis (z interny), w 1984 r. rozpoczął staż w Huges Medical Institute. Wkrótce dołączył do grupy Lefkowitza, z którym następnie pracował przez wiele lat. Na początku pracy Kobilka dostał jako zadanie wyizolowanie z ludzkiego genomu genu kodującego receptor beta2–adrenergiczny. Wysiłki Kobilki zakończyły się sukcesem i w 1986 r. obaj badacze opublikowali wyniki doświadczeń wykazujące na homologię receptora beta2–adrenergicznego z rodopsyną, receptorem reagującym na strumień światła [5]. W 2000 r. Krzysztof Palczewski, uczony polski od lat mieszkający i pracujący w Stanach, otrzymał wraz ze współpracownikami rodopsynę w postaci krystalicznej i ustalił jej strukturę [17]. Wydedukowana na podstawie badań z użyciem metod biologii molekularnej struktura receptora beta2–adrenergicznego wydawała się podobna do tej ustalonej szczegółowo dla rodopsyny. Przypominamy, że rodopsyna, choć odbierająca sygnał fizyczny (foton światła), jest także związana z białkiem G, białkiem Gt. Te dane pozwoliły Lefkowitzowi na wysunięcie postulatu, że najprawdopodobniej receptory związane z białkami G, receptory GPCR, mają wszystkie podobny plan budowy [9]. Ten postulat został potwierdzony przez Kobilkę, gdy wraz ze współpracownikami doprowadził w 2007 r. do krystalizacji receptora beta2–adrenergicznego [19] (patrz także artykuł przeglądowy [8]).

Badania, prowadzone ze znaczącym udziałem Lefkowitza i Kobilki, pokazały, że wszystkie receptory GPCR mają identyczny plan budowy. Są długimi, po-

jedynymi łańcuchami białkowymi zbudowanymi z paruset reszt aminokwasów. Na podstawie analizy hydrofobowości i hydrofilności poszczególnych fragmentów łańcucha białkowego receptora początkowo dedukowano, a następnie po krystalizacji receptora wykazano, że białko receptorowe siedem razy przenika przez lipidową błonę, tworząc w niej siedem oddzielnych domen (H1–H7). Fragmenty łańcucha we wszystkich tych domenach składają się z 20–25 reszt hydrofobowych aminokwasów i mają budowę alfa-helisy. Te helikalne domeny są połączone ze sobą naprzemiennie odcinkami hydrofilowymi łańcucha tworzącymi pętle. Zarówno po stronie zewnętrznej komórki, jak i wewnątrz, w cytozolu, domeny są połączone trzema pętlami. Schematyczny model receptora – łańcucha białkowego siedmiokrotnie przekraczającego błonę plazmatyczną, przedstawia rycina 3. Jak widzimy, koniec aminowy białka receptorowego (N–koniec) jest usytuowany na zewnątrz. Koniec karboksylowy (C–koniec) jest zanurzony w cytozolu i zawiera reszty aminokwasów ulegające fosforylacji. Białko G wiąże się z receptorem w obrębie jego trzeciej pętli (C3) znajdującej się w cytoplazmie (Ryc. 3). W wiązaniu agonisty (hormonu, neurotransmitera)

wodorowe molekule agonisty. Pionierskie badania Lefkowitza wyjaśniły mechanizm łączenia agonisty, hormonu, z receptorem beta2–adrenergicznym, wskazując na istotną rolę w tym procesie kwaśnych reszt kwasu asparaginowego w helisie 3 (H3) i seryny w helisie 5 (H5), tworzących „kieszki” i wiążących grupę aminową i grupy katecholowe adrenaliny [24]. Zasługą Lefkowitza było także wyjaśnienie procesu desensytyzacji (odczulania) receptora beta2–adrenergicznego. Małe stężenia agonisty wywołują zmniejszenie powinowactwa receptora i samoistne odszczepienie agonisty. Przy wysokim stężeniu nie następuje odłączenie agonisty i ufosforylowany w wyniku działania kinazy receptor wraz z przyłączonym tzw. białkiem adaptorowym, beta–arestyną, ulega internalizacji. W procesie fosforylacji bierze udział specyficzna kinaza BARK i po odłączeniu podjednostki alfa, aktywującej cyklazę adenylanową, kompleks podjednostek beta/gama białka Gs jest związany z receptorem. Internalizacja prowadzi do endocytozy i albo do degradacji receptora albo, po defosforylacji i odłączeniu pozostałych białek, do ponownego wbudowania receptora do błony plazmatycznej [8,13].

Badania Lefkowitza i Kobilki wniosły znaczący



Ryc. 3. Typowa budowa receptora związanego z białkiem G. Omówienie budowy, patrz tekst.

docierającego do receptora nie biorą udziału pętle zewnątrzkomórkowe łańcucha białkowego. Agonista wnika w głąb błony i dociera do tzw. „kieszki” utworzonej przez reszty aminokwasów należących do helis transbłonowych, łączących jonowo, lub przez mostki

postęp w poznanie struktury i mechanizmów działania rodziny receptorów GPCR. **Obaj badacze za badania nad receptorami związanymi z białkami G zostali w 2012 r. uhonorowani Nagrodą Nobla z dziedziny chemii.** Nagroda Nobla przyznana za te

osiągnięcia ma nie tylko aspekt poznawczy, naukowy, ale także praktyczny. Jak powiedziano powyżej, receptory GPCR stanowią najliczniejszą rodzinę receptorów błonowych w świecie żywym, a więc i w organizmie człowieka. Związki syntetyczne, egzogenne, mają budowę odmienną od związków naturalnych, ale mają domeny przestrzenne na tyle podobne, że mogą wiązać się do receptora. Znając strukturę receptorów można zatem produkować leki działające podobnie jak agoniści (ligandy) aktywujące receptory, lecz także leki działające jako antagoniści hamujące ich działanie [12]. Prócz działania bezpośredniego, pobudzającego lub hamującego, leki mogą także działać pośrednio, modulując sygnał docierający do receptora. Lekarstwa działające jako antagoniści nie wywołują zmian konformacyjnych białka receptorowego, ale wiążąc się z nim uniemożliwiają działanie naturalnym ligandom. Wiązanie to jest często nieodwracalne. Jedną z najważniejszych grup leków stosowanych obecnie są antagoniści receptorów beta–adrenergicznych. Leki te, tzw. beta–blokery, są używane w chorobach układu krążenia, nadciśnieniu czy zaburzeniach rytmu serca. Natomiast lekarstwa pobudzające receptory beta–adrenergiczne wywołują rozkurcz kanalików oskrzelowych i są używane w leczeniu astmy. Z kolei leki blokujące receptor histaminowy H1 stosuje się w alergii, co znosi objawy wywołane przez histaminę i pomaga w chorobie. Działanie antagonistyczne wywołują także leki psychotropowe stosowane w psychiatrii, działające blokująco na receptor dopaminowy D2,

a leki przeciwdepresyjne działają pośrednio na układ serotoninowy lub/i noradrenergiczny, zwiększając dostępność aktywatorów receptorów w przestrzeni synaptycznej. Także produkowane obecnie leki przeciwnowotworowe opierają się na znajomości zaburzeń występujących w komórkowej sygnalizacji [12].

Te kilka powyższych przykładów pokazuje, że współczesna farmakoterapia w dużej mierze opiera się na wiedzy związanej z przekazywaniem sygnałów w komórce, w tym wiedzy wypływającej z badań nad budową i działaniem receptorów związanych z białkami G, najliczniejszej rodziny receptorów występujących w błonie plazmatycznej komórek. Znaczenie i waga tych badań wydają się zatem oczywiste.

Podsumowanie

Artykuł rozpoczyna przedstawienie sylwetki Paula Ehrlicha, który wprowadził pojęcie receptora jako miejsca w błonie plazmatycznej komórki, do którego łączą się leki, a kończy rozważanie nad rozwojem farmakoterapii jako efektu poznania struktury receptorów i mechanizmów działania na nie określonych leków. A więc historia badań naukowych zatoczyła koło! Z przedstawionych badań wypływa też nauka głosząca, że nie należy zbyt zrażać się niepowodzeniami, bo często to one wyznaczają właściwe kierunki i bywają motorem prowadzącym do najistotniejszych odkryć naukowych.

Bibliografia

1. Barańska J. (1994). Białka G – Nagroda Nobla 1994. *Post. Biol. Kom.*, 21: 479–488.
 2. Barańska J. (1997). Nobel dla białek G. W: *Receptory, struktura, charakterystyka, funkcja*. Nowak J.Z., Zawilska J. B. (red). PWN, Warszawa, 28–42.
 3. Barańska J., Kłopocka W. (2004). Białka G – rola w przekazywaniu sygnałów. W: *Szlaki przekazywania sygnałów komórkowych*. Nalepa I. (red). XXI Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN., Mogilany, 17–27.
 4. Bilski R., Kaulbersz J. (1987). Napoleon Cybulski, 1854–1919. *Acta Physiol. Pol.*, 38: 74–90.
 5. Dixon R.A., Kobilka B.K., Strader D.J., Benovic J.L., Dohlman H.G., Frielle T., Bolanowski M.A., Bennett C.D., Rands E., Diehl R.,E., Mumford R.A., Slater E.E., Sigal I.S., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Strader C.D. (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta–adrenergic receptor and homology with rodopsin. *Nature*, 321: 75–79.
 6. Hepler J.R., Gilman A.G. (1992). G proteins. *TIBS*, 17: 383–387.
-

7. Konarska L. (1995). Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. PWN, Warszawa, 1–230.
8. Latek D., Modzelewska A., Trzaskowski B., Palczewski K., Filipek S. (201). G protein–coupled receptors – recent advances. *Acta Biochem. Polon.*, 59, 515–529.
9. Lefkowitz R.J. (2000). The superfamily of heptahelical receptors. *Nat. Cell. Biol.*, 2: E133–136.
10. May D.C., Ross E.M., Gilman A.G., Smigel M.D. (1985). Reconstruction of catecholamine–stimulated adenylyl cyclase activity using three purified proteins. *J. Biol. Chem.*, 260: 15829–15833.
11. Monod J., Wyman J., Changeux J.P. (1965). On the nature of allesteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.*, 12: 88–118.
12. Nalepa I. (2003). Leki a przekazywanie wewnątrzkomórkowe. W: *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii*. Kostowski W., Herman Z.S. (red), PZWL, Warszawa, 100–126.
13. Nalepa I., Vetulani J. (2004). Receptory adrenergiczne. W: *Receptory i mechanizmy przekazywania sygnałów*. Nowak J.Z., Zawilska J.B. (red), PWN, Warszawa, 245–273.
14. Northup J.K., Sterweis P.C., Smigel M.D., Schleifer L.S., Ross E.M., Gilman A.G. (1980). Purification of the regulatory component of adenylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77: 6516–6520.
15. Nowak J.Z., Zawilska J.B. (1997). Receptory, struktura, charakterystyka, funkcja. PWN, Warszawa, 1–374.
16. Nowak J.Z., Zawilska J.B. (2004). Receptory i mechanizmy przekazywania sygnałów. PWN, Warszawa, 1–631.
17. Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C.A., Motoshima H., Fox B.A., Le Trong I., Teller D.C., Okada T., Stenkamp R.E., Yamamoto M., Miyano M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein–coupled receptor. *Science*, 289: 739–745.
18. Rall T.W., Sutherland E.W., Berthet J. (1957). The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. Effect of epinephrine and glucagon on the reaction of phosphorylase in liver homogenates. *J. Biol. Chem.*, 224: 463–475.
19. Rasmussen S.G.F., Choi H.J., Rosenbaum D.M., Kobilka T.S., Thian F.S., Edwards P.C., Burghammer M., Ratnala V.R.P., Sanishvili R., Fischetti R.F., Schertler G.F.X., Weis W.I., Kobilka B.K. (2007). Crystal structure of the human beta(2)adrenergic G protein–coupled receptor. *Nature*, 450: 383–387.
20. Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S.L., Kraus H.M.J. (1971). The glucagon–sensitive adenylyl cyclase system in plasma membrane of rat liver. An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action. *J. Biol. Chem.*, 246: 1877–1882.
21. Rodbell M. (1980). The role of hormone receptors and GTP–regulatory proteins in membrane transduction. *Nature*, 284: 17–22.
22. Rodbell M. (1992). The role of GTP–binding proteins in signal transduction: From the sublimely simple to the conceptually complex. *Curr. Top. Cell Regul.*, 32: 1–47.
23. Ross E.M., Gilman A.G. (1977). Resolution of some components of adenylyl cyclase necessary for catalytic activity. *J. Biol. Chem.*, 252: 6966–6969.
24. Shorr R.G., Lefkowitz R.J., Caron M.G. (1981). Purification of the beta–adrenergic receptor. Identification of the hormone binding subunit. *J. Biol. Chem.*, 256: 5820–5826.
25. Sutherland E.W., Robinson G.A. (1966). The role of cyclic–3',5'–AMP in response to catecholamines and other hormones. *Pharmacol. Rev.*, 18: 145–161.