

Nobeli meditsiini- ja keemiapreemia 2012. aasta laureaatide panus arstiteaduse arengusse

Toivo Maimets – TÜ molekulaar- ja rakubioloogia instituut

RAKKUDE TAGASIPROGRAMMEERIMINE

2012. aasta Nobeli füsioloogia- ja meditsiini-preemia said **John Gurdon** (Ühendkuningriik) ja **Shinya Yamanaka** (Jaapan) avastuse eest, et täiskasvanud rakke on võimalik tagasi programmeerida pluripotentsesse olekusse. Nobeli meditsiini-preemia antakse tavaliselt suurepärasele teadlastele, kelle tööd on muutnud teadusala paradigmat ja mõtteviisi ning on osutunud ka praktiliselt väärtuslikuks. Nii ka seekord.

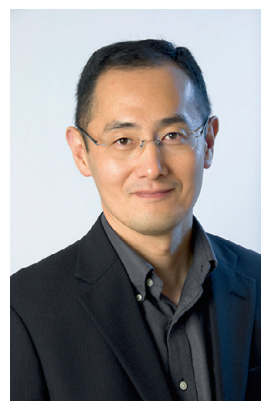
Mis on rakkude pluripotentsus? Õige lühidalt öeldes on see rakkude võime anda diferentseerudes kõiki selle organismi raku tüüpe ning säilitada pooldumiste kaudu ka iseenda populatsiooni. Me oleme pärit ühestainsast rakust, viljastatud munarakust ehk sügootidist ja kõik meie rakud (neid on aga enam kui 10^{13}) on selle ühe raku järglased ning tekkinud arvukate pooldumiste ja diferentseerumiste tulemusena. Sügoot on totipotentne, kõikvõimas, sest suudab anda nii kõiki tulevase organismi rakke kui ka looteväliseid kudesid, mis osalevad näiteks platsenta moodustumises. Õige varsti pärast viljastamist algab rakkude pooldumine ning esialgu on tegu üsna sarnaste rakkude kobaraga ehk moorulaga. 4–5 päeva pärast inimese munaraku viljastamist toimub aga esimene selge rakkude eristumine (diferentseerumine). Embrüo, mille nimeks nüüd on blastotsüst, näeb välja nagu 0,7 mm läbimõõduga jalgpall, mille pinnal on trofektodermi rakud (neist arenevad lootevälised struktuurid), sees aga ühes servas nn sisemise rakumassi (*inner cell mass*, ICM) rakud. Neist viimastest tekivadki kõik tulevase inimese 250–300 raku tüüpi, mistõttu kutsutakse ICMi-rakke pluripotentseteks. Kui need selles etapis eraldada ja kunstlikes tingimustes kasvatama hakata, saadakse embrüonaalsete tüvirakkude liin,

mille rakud on samuti pluripotentsed. Just selle omaduse tõttu on embrüonaalsed tüvirakud seotud lootusega luua uusi raviviise paljude haiguste (näiteks parkinsonism, Alzheimeri tõbi, I tüüpi diabeet, mitmed kasvavad) jaoks, mis on seotud rakkude hävimisega. Seega on pluripotentsus seotud rakkude väga fundamentaalse omadusega, mis hiljem diferentseerumise edenedes üha väheneb. Näiteks on vereloome tüvirakud oligopotentsed ehk vähem potentsed, andes edasi diferentseerudes vaid mõnda tüüpi vererakke. Enamik täiskasvanu rakke on aga lõplikult diferentseerunud ning toodavad vaid endasuguseid.

1927. aastal nentis USA teadlane Frank Lillie ajakirjas *Science*, et bioloogiateadus on jõudnud lahendamatu dilemmani. Ühest küljest oli selge, et kõigis inimese rakkudes on ühesugune pärilikkuseaine – DNA. Teisalt aga on erinevaid funktsioone täitvaid ja erineva välimusega raku tüüpe väga palju ning takkapihta läbivad nad organismi arengu käigus mitmesuguseid muutusi. Kuidas saavad samasugused geenikomplektid põhjustada selliseid suuri erinevusi? Lillie kolleeg Edmund B. Wilson pakkus välja, et arengu käigus toimuva diferentseerumise jooksul n-ö suletakse üha enam geene ning alles jääb ainult nende geenide avaldumine, mis on iseloomulik kindlale raku tüübile. Kuna täiskasvanud organismis ei toimu ühe raku tüübi üleminekut teiseks, siis kujunes veendumus, et selline rakkude diferentseerumine on ühesuunaline ja tagasipöördumatu. Diferentseerumist ja indiviidi arengut kirjeldas Conrad Waddington kui marmorkuulide mäest allaveeremist: kui kuul on alles mäetipus (pluripotentne rakk), siis võib ta veereda mistahes suunas. Kui aga liikuma on juba hakatud, siis enam üles ei ronida ei saa ning teised suunad on välistatud. Edasi, allapoole liikudes tuleb



Prof John B. Gurdon.
Foto: Wellcome Library, London



Prof Shinya Yamanaka
Foto: Chris Goodfellow, Gladstone Institutes

üha enam n-ö orge ja lõhesid, kust tagasipöördumine on üha võimatum. Lõpuks peatub kuul kusagil orus või kaljulõhes ja vastab analoogia põhjal lõplikult diferentseerunud rakule.

1960. aastate alguses aga otsustas John Gurdon seisukoha rakkude diferentseerumise pöördumatusest vaidlustada. Ta võttis kannuskonna (*Xenopus laevis*) munaraku ning inaktiveeris selle tuuma ultraviolettkiirgusega, millega välistati munaraku enda pärikkuseaine mõju. Seejärel võttis ta uue rakutuuma konnakullese diferentseerunud epiteelirakust ning viis selle töödeldud munarakku. Uue tuumaga rakk aga käitus nagu tavaline viljastatud munarakk: ta läbis embrüogeneesi, arenes kulleseks ja seejärel korralikuks konnaks. Seega osutus võimalikuks, et diferentseerunud epiteeliraku arengut sai tagasi pöörata pluripotentsesse olekusse, millest omakorda said tekkida kõik uue organismi rakud. Need molekulid, mis sellise tagasipöördumise võimalikuks tegid, olid ilmselt olemas munarakus. Sündinud oli somaatilise raku tuumaülekanne (SCNT) meetod, millega kolmkümmend aastat hiljem (1997) loodi lammas Dolly ning klooniti mitmete teiste loomaliikide isendeid.

Rakkude tagasiprogrammeerimist juhtivad valgud

Jaapanlane Shinya Yamanaka otsustas täpsemalt selgitada, millised munarakus olevad molekulid võimaldavad äsja kirjeldatud tagasiprogrammeerimist. Ta oli töötanud embrüonaalsete tüvirakkudega ja teadis, et ka need suudavad sarnaselt munarakuga sama efekti esile kutsuda. Samas oli ka teada, et embrüonaalsetes tüvirakkudes toodetakse mitmesuguseid valke, mida enam diferentseerunud rakkudes ei leidu. Ta võttis 24 sellise valgu geenid ning viis need retroviiruse kasutades diferentseerunud fibroblasti ning tulemuseks oli tõepoolest pluripotentse raku teke. Edasi hakkas ta ükshaaval mittevajalikke gene välistama ning jõudis lõpuks nelja olulise valguni – Oct4, Sox2, Klf4 ja Myc –, millest piisas pluripotentsuse tekitamiseks. Niiviisi tekitatud rakke hakkas ta kutsuma **indutseeritud pluripotentseteks tüvirakkudeks** (*induced pluripotent stem cells*, iPS-rakud) ning edaspidi selgus, et nad olid tõepoolest igas mõttes pluripotentsed – neist sai tekitada kõiki raku- ja koetüüpe ning lõpuks ka uusi terviklikke organisme.

Hilisemad tööd on näidanud, et hakkama saab ka kolme valguga ning ka neist saab veel mõnda asendada väikesemolekuliliste kemikaalidega.

On selge, et iPS-rakkude tehnika võimaldab põhimõtteliselt toota „tagavaraosi“ selliste haiguste puhul, kus on tegu rakkude hävimisega, kusjuures loodetakse, et tänu patsiendi enda rakkudele ei ole ka olulisi probleeme immuunreaktsioonidega. Viimasel paaril aastal on ilmunud ridamisi töid, kus katseloomadel on suudetud edukalt korrigeerida parkinsonismi või ka näiteks sirprakulise aneemia sümptomeid. Tuleb aga rõhutada, et praktiline läbimurre sellel alal ei toimu veel homme ega järgmisel aastal, sest liiga palju on veel tundmatut, mida saab lahendada vaid järjekindla uurimistööga. On näiteks selge, et iPS-rakkudel on geneetilisi muudatusi, nende geeniekspressiooni muster erineb embrüonaalsete tüvirakkude omast ning samuti kannavad nad osaliselt kaasas algkoole iseloomulikke epigeneetilist mustrit.

Küll on aga läbimurdeliseks osutunud iPS-rakkude kasutamine haigusmudelite loomisel. Paljude geneetiliste haiguste uurimiseks on tehtud sarnased geenimoodatused katseloomadel, kelleks sageli on hiired või rotid. Lootus on, et kui mutatsioon tekitab sarnaseid haigusnähte ka katseloomadel, siis saab uurida nende haiguste tekkemehhanismi ning leida näiteks aineid, mis suudaks häireid korrigeerida ehk oleks potentsiaalselt ravimiteks. Paraku tuleb tõdeda, et hiir ja inimene on üsna erinevad ning geenimuutus, mis inimese puhul kindlaid haigusnähte tekitab, ei pruugi seda hiire puhul teha (ja ka vastupidi). Lisaks on hiire metabolism ning sestap reaktsioonid erinevatele ainetele inimese omadest tihti väga erinevad.

iPS-rakud on võimaldanud luua inimese haiguse mudeleid inimrakkudel. Patsiendi somaatilisest rakust loodud iPS-rakkude liinid on andnud võimaluse uurida väga paljude haiguste tekkemehhanismi ning katsetada võimalikke raviviise. Erinevaid sündroome, mis uurimise all, on juba üle viiekümne ning siia kuuluvad näiteks Duchenne'i lihasedüstroofia, Alzheimeri tõbi, tsüstiline fibroos ja perekondlik hüperkolesteroneemia. See nimekiri pikeneb sõna otseses mõttes iga nädal.

Muidugi ei saa tähelepanuta jätta, et kui pluripotentsed rakud, olgu nad embrüo-

naalsed tüvirakud või iPS-rakud, suudavad tekitada kõiki organismi rakutüüpe, siis suudavad nad anda ka sugurakke. Spermi loomine sellistest rakkudest on juba võimalik olnud mitu aastat. Eelmisel aastal teatati ka iPS-rakkude abil mehe viljatusravist. Defektse spermatogeneesi mehe naharakust tehti iPS-rakk ning sellest omakorda sperm. Abikaasa munarakk viljastati sellega ning tulemuseks oli normaalse lapse sünn. Vaid paari nädala eest aga teatasid Jaapani teadlased, et neil on õnnestunud luua hiire pluripotentsest tüvirakust ka munarakud, need viljastada ning välja arendada täisväärtuslikud organismid. Seega on võimalik iPS-rakutehnoloogiaga saada nii sperme kui ka munarakke ning sealt edasi terveid organisme. Eriala-teadlastel koos bioetikutega on siin taas probleeme, mille üle mõelda.

SÕNUMID RAKKUDELE

2012. aasta Nobeli keemiapreemia said USA teadlased **Brian K. Kobilka** ja **Robert J. Lefkowitz** G-valkudega seotud retseptorite uurimise eest. Hulkraks organismis peab iga keharakk n-ö teadma, mis ümbritsevas keskkonnas toimub: kas on vaja hakata poolduma, mingis suunas diferentseeruma või näiteks hoopis surra. Et rakud oleksid toimuvast informeeritud ning reageeriks nii nagu organismile tervikuna vajalik, on olemas mitmesugused signaalmolekulid, mida toodavad sihtrakkudest kaugemal või lähemal olevad rakud. Kui selline signaalmolekul jõuab raku pinnani, siis peab sellega toodud sõnum kuidagi edastatama raku sisemusse, et toimuksid vajalikud muudatused raku metabolismis ja tihti ka geenide töös. Mõnikord tungib sõnumitooja selleks ise raku sisse, enamasti aga see nii ei ole.

XIX sajandi lõpul avastati, et adrenaliin põhjustab südamerütmi kiirenemist, vererõhu tõusu ja pupillide laienemist, s.t soodustab organismi valmisolekut aktiivseks füüsiliseks tegevuseks laadis „võitle või põgene“. Selgusetuks jäi aga, millise mehhanismi kaudu adrenaliini toime realiseerub. Algul arvati, et mõju käib närvisüsteemi kaudu, ent kui katseloomadel närvisüsteem blokeeriti, toimis adrenaliin ikkagi. Rakud aga, mis adrenaliinile reageerisid, seda molekuli ennast ei sisaldanud. Kuna raku eristab teda ümbritsevast maailmast rakumembraan, siis oli selge, et membraanis pidid olema mingid kohad, mis adrenaliini

efekti vahendavad, kandes rakuvälise adrenaliinimolekuli olemasolu signaali mingil viisil raku sisemusse üle.

Selliseid signaalide vahendajaid hakati nimetama rakupinna retseptoriteks, ent nende keemiline olemus jäi aastakümneteks mõistatuseks. Sellest hoolimata õnnestus alates 1940. aastatest luua mitmeid ravimeid, mis neid sel ajal veel hüpoteetilisi retseptoreid agonistidena aktiveerisid või antagonistidena inhibeerisid. Raymond Ahlquisti tööd näitasid, et adrenaliiniretseptoreid on vähemalt kaht tüüpi: ühtede kaudu käib veresoontega seotud silelihasrakkude kokkutõmbumine, teised stimuleerivad põhiliselt südant. Ta nimetas need retseptorid vastavalt alfa- ja beetaretseptoriteks ning 1964. aastal töötas James Block välja esimese beetablokaatori propranolooli, mis sai laialt kasutatavaks ravimiks südame rütmihäirete ning kõrge vererõhu puhul.

1960. aastate lõpul otsustas Robert Lefkowitz välja selgitada, kus need retseptorid täpselt asuvad ning millest koosnevad. Ta tuli mõttele kasutada radioaktiivselt märgistatud hormoone, mis rakkudega seonduksid märgivad ära retseptorite asukoha. Töö tulemusena õnnestus mitmetest kudedest eraldada vastavad retseptormolekulid, mis osutusid üsna suurteks valkudeks. Saamaks aga täpsemat teavet nende valkude töö mehhanismi kohta, tuli eraldada geenid. Geenide kaudu on võimalik teada saada, milliseid aminohappejärjestusi valk sisaldab, see omakorda annab võimaluse püstitada hüpoteese selle molekulaarse tööpõhimõtte kohta. Geeni eraldamisega hakkas tegelema Lefkowitzi noor kolleeg, järel doktorant Brian Kobilka. Visa töö tulemusena saadi geenijärjestus, mis pakkus mitmesuguseid üllatusi. Osutus, et valgus on seitse pikka hüdrofoobset aminohappejärjestust, mis moodustavad heeliksstruktuuri. Tundus loogiline, et kuna rakumembraan koosneb põhiosas hüdrofoobsetest lipiididest, siis ilmselt see valgumolekul ulatub seitse korda läbi rakumembraani, ühendades nõndaviisi nii raku välis- kui ka sisekeskkonda. Need on justkui seitse heeliksipulka, mis ulatuvad läbi rakumembraani.

Selleks ajaks oli midagi sarnast leitud ka silma reetinas, sest valguse retseptoril rodopsiinil (mille oli eraldanud 1954. aastal Ruth Hubbard) oli samasugune seitsmest osast koosnev transmembraanne järjestus. Samuti olid selleks ajaks teada G-valgud,



Prof Brian K. Kobilka

Foto: SIPA USA/Scanpix



Prof Robert J. Lefkowitz.

Foto: Stewart Waller

mille avastamise eest saadi Nobeli meditsiini-preemia 1994. aastal ja mis on käesoleva loo jaoks ülitähtsad. G-valgud on heterotrimeersed ehk kolmest erinevast aminohappeahelast koosnevad valgud raku sees, mis retseptorilt signaali saades muudavad oma struktuuri, lagunevad kolmeks eraldi peptiidiks ning käivitavad seejärel raku olulisi metaboolseid muutusi. Selleks vajatakse energiat, kuid see ei pärine mitte adenosiintrifosfaadist (ATP), vaid temaga sarnasest guanosiintrifosfaadist (GTP), millest on tuletatud ka kõnealuste valkude nimetus.

Retseptorite struktuuri täpne tundmine on uute ravimite loomise lähtealus

Geenijärjestus annab küll võimaluse püstitada mitmesuguseid hüpoteese valgu struktuuri kohta, ent tema tegeliku struktuuri n-ö nägemiseks on vaja teistsuguseid meetodeid. Eelkõige on selleks röntgenstruktuuranalüüs, mille tegemiseks on aga kõigepealt vaja teha valgukristall, kus paljud valgumolekulid on korrapäraselt kokku pakitud. Seejärel kiiritatakse kristalli röntgenkiirtega, mis kristalliga pörkudes teatud viisil hajuvad, ning selle hajumismustri järgi ongi võimalik teha järeldusi valgu tegeliku struktuuri kohta. Palju lihtsama G-valguga seotud retseptori (GPCR) valgu rodopsiini röntgenstruktuur avaldati 2000. aastal, β -adrenoretseptori struktuur õnnestus Kobilkal ja tema kaaslastel välja selgitada alles 2010. aastal. Aasta hiljem kirjeldas ta sama meetodiga ka n-ö töötavat kompleksi, kus β -adrenoretseptor oli ühelt poolt seondunud adrenaliiniga molekuli, teiselt poolt aga rakusisese G-valguga. Hämmastavalt selgelt oli näha, et adrenaliinimolekuli seondumine retseptori rakuvälise osaga sunnib seal seitset transmembraanset retseptori osa (rakku läbivate n-ö pulkade otsi) kokku tõmbuma. Teises, rakusiseses otsas aga lähevad otsad just laiali ning moodustavad avause, kuhu omakorda saab seonduda G-valk. Selline seondumine aga käivitab hulga järgmisi olulisi keemilisi muutusi raku sees, mistõttu rakk reageeribki signaalmolekul adrenaliinile raku välispinnal. Nüüdseks on teada veel 13 GPCRi röntgenstruktuur ning need teadmised on saanud asendamatuks uudsete ravimite väljaarendamisel. Ajakirja Science väitel toimivad kuni pooled kõigist

tänapäeval kasutatavatest ravimitest just G-valkudega seotud membraaniretseptorite kaudu.

Tänu inimese genoomijärjestuse avaldamisele on nüüd teada, et erinevaid GPCRi molekule on organismis ligi tuhat. Seega on inimese genoomi valke kodeerivast osast peaaegu 5% just selle molekuli klassi geenideks. Umbes pooled neist valkudest reageerivad lõhnadele, kolmandik aga on retseptoriks mitmesugustele hormoonidele ja teistele signaalmolekulidele. Mõned neist asuvad silmas ja reageerivad valgusele, teised aga asuvad keelel ja tekitavad maitseid. Ehkki retseptoritesse toimivad signaalmolekulid võivad olla väga erinevad (fotonid, lõhnaained, neurotransmitterid, hormoonid, erinevad peptiidid), käib retseptorites tekkiva aktiveerimissignaali vahendamine raku pinnalt tema sisemusse üsna sarnaselt 7 korda membraani läbivate valkude ning nendega seotud G-valkude abil, mis saadud signaali järel omakorda aktiveeruvad ning edastavad signaali raku juba järgmistele molekulidele.

Samas ei ole enam kui saja geenijärjestusest teada oleva GPCR retseptori funktsioon seni veel teada. Ka on selgunud, et mitte kõik GPCRid ei toimi tegelikult G-valkude kaudu, vaid see võib realiseeruda ka näiteks arstiini nimeliste valkude kaudu. Seetõttu nimetatakse neid retseptoreid üha enam 7 korda membraani läbivateks retseptoriteks, sest nimetatud omadus on neile tõepoolest ühine.

Tänavused keemiapreemia laureaadid Lefkowitz ja Kobilka õppisid tegelikult arstiks, ent hakkasid pärast õpinguid üha enam huvituma fundamentaalteadustest. Näiteks oli Lefkowitz Columbia Ülikooli arstiteaduskonnas oma lennu parim lõpetaja, suundus sealt aga tööle teadusuurijana Riiklikku Terviseinstituuti (NIH). Ameerika Keemiaühingu president Bassam Shakshiri kommenteeris tänavust preemiat oma blogis järgmiselt: „Keemia on tunginud kõigisse loodusteadustesse. Keemia tähtsus on tänaseks saanud niivõrd kõikehõlmavaks, et ta ei ole mitte ainult hävitanud erinevate loodusteaduste vahelised traditsioonilised vaheseinad, vaid isegi riskib juba iseenda identiteedi kaotamisega.“ Sellest ilmselt on aga võitnud kõik loodusteadused.

toivo.maimets@ut.ee