

Robert Lefkowitz y Brian Kobilka: premios Nobel 2012



Linda A. Cicero/Sanford News Service

Brian K. Kobilka en conferencia de prensa después de su nombramiento como Premio Nobel de Química 2012

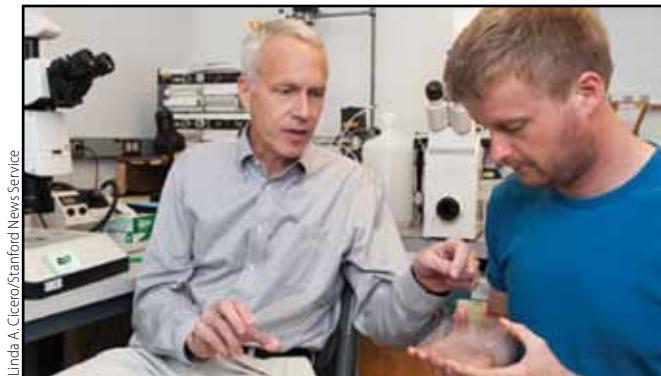
La Real Academia de las Ciencias de Suecia anunció que el Premio Nobel de Química 2012 será entregado a los Dres. Robert Lefkowitz y Brian Kobilka. Una decisión que nos llenó de alegría a todos los que nos dedicamos al estudio de los receptores para hormonas y neurotransmisores. Desde hace más de 15 años se esperaba que Lefkowitz recibiera en algún momento el Premio Nobel por sus contribuciones al conocimiento de los receptores para la adrenalina y el espectacular trabajo de Kobilka sobre su cristalización lo hacían también un destacado candidato a este reconocimiento.

La historia de la adrenalina y sus receptores arranca con el descubrimiento de Oliver y Shäffer, en 1895, de los efectos cardiovasculares de extractos de la glándula suprarrenal y fue seguido por la purificación, en forma independiente, del “principio activo” por John Abel en los Estados Unidos y Jokichi Takamine, investigador de origen japonés, en el Reino Unido. El concepto de Langley (1905) de que los agentes no actúan a distancia, sino que se fijan a una “sustancia receptiva” o receptor, rá-

pidamente penetró en el campo de la adrenalina. En los primeros años del siglo XX también se dan pasos importantes estableciendo que la adrenalina y la noradrenalina comparten muchos de sus efectos, donde una predominantemente es la hormona, y la segunda predominantemente un neurotransmisor. Sin embargo, pasaron muchos años para que Raymond Ahlquist (1948), con base en la potencia relativa de diversos agonistas, estableciera que existen 2 tipos de receptores: los alfa-adrenérgicos y los beta-adrenérgicos. Demos un gran salto en el tiempo para mencionar que hoy sabemos que la adrenalina y la noradrenalina comparten 9 diferentes tipos de receptores codificados por distintos genes, es decir, 3 receptores de la subfamilia beta (β_1 , β_2 y β_3), 3 de la α_1 (α_1A , α_1B y α_1D) y 3 de la α_2 (α_2A , α_2B y α_2C). Estos receptores se expresan en forma diferencial en los tejidos y mucho de su funcionamiento y regulación, así como sus intimidades moleculares se han ido descubriendo. El trabajo de Lefkowitz y Kobilka está inseparablemente unido a esta epopeya de la medicina; pudiera decirse que el concepto de receptor adrenérgico se “materializó” con su trabajo¹.

Robert Lefkowitz nació en Nueva York en 1942 y desde muy joven estaba convencido de que estudiá-

¹Instituto de Fisiología Celular. UNAM. México, DF.
<http://www.ifc.unam.mx/researchers/garcia-sainz/es>
Correo electrónico: agarcia@ifc.unam.mx



Linda A. Cicero/Stanford News Service

Brian Kobilka (izquierda) en su laboratorio

ría Medicina². Realizó sus estudios premédicos en el Columbia College con especialidad en química, su formación como médico en el Columbia College of Physicians and Surgeons y su internado y residencia en el Columbia Presbyterian Medical Center. Atraído por la medicina académica fue aceptado por Jesse Roth, uno de los pilares de la endocrinología molecular de los Estados Unidos, en los National Institutes of Health en Bethesda, Maryland. Fue allí donde Lefkowitz se contagió para siempre de la pasión por la investigación. Cuenta Lefkowitz, que después de leer unas revisiones de Earl Sutherland, quien recibió el Premio Nobel por el descubrimiento del AMP cíclico y el sistema de la adenilil ciclasa, decidió con Jesse Roth tratar de cuantificar los receptores para ACTH. El proyecto esencialmente consistía en marcar con yodo radioactivo a la hormona, determinar su asociación a preparación de membranas y su capacidad para activar a la adenilil ciclase. Tras un año de frustraciones en intentos fallidos las cosas empezaron a funcionar y pronto publicó su primer trabajo³, seguido de otros en que se establecieron las condiciones necesarias para cuantificar receptores para hormonas peptídicas en las membranas de las células. Estos trabajos fueron un hito pues permitieron cuantificar la presencia de receptores. Es decir, lo que antes era esencialmente conceptual se podía ya medir.

Lefkowitz regresó a Boston a continuar su carrera de médico y a “perpetuar el mito de que los residentes no requieren dormir”. A pesar de su gusto por la clínica, relata que tenía cierta insatisfacción: le faltaban datos. No recibía el placer de sacarle al-

gún secreto a la naturaleza. Por ello decide trabajar adicionalmente en el laboratorio del Dr. Haber donde empieza a estudiar los receptores adrenérgicos en preparaciones de corazón utilizando adrenalina tritiada⁴. También es con este grupo que inicia sus esfuerzos por purificar un receptor. A todos los que somos médicos nos resulta claro el desgaste que ocasiona la actividad clínica, las tensiones de la evolución de los pacientes y las guardias. Sin embargo, los que conocemos a Lefkowitz sabemos que entre sus características más notorias están: un enorme entusiasmo y una energía casi inagotable.

Hacia 1972, Lefkowitz recibe una oferta del jefe de Cardiología de Duke University para incorporarse al Departamento de Medicina como investigador con un amplio espacio y recursos para poder trabajar. Es en esta universidad donde Lefkowitz ha realizado todo su trabajo independiente y se ha convertido en el primer investigador que obtiene el Premio Nobel por su trabajo allí. Su inteligencia, ambición y energía lo llevan a rápidamente a atraer a su laboratorio excelentes estudiantes y posdoctorales. Pronto el grupo de Lefkowitz es nombrado en el medio como la “armada de Lefko” (*Lefko’s army*).

Además de sus contribuciones personales, Lefkowitz es conocido por su capacidad para formar investigadores de alto nivel; por su laboratorio han pasado más de 200 estudiantes, posdoctorales y visitantes de corto y mediano plazo. Muchos de ellos, incluido Brian Kobilka, por supuesto, son auténticos líderes en el campo. Ralf Snyderman, investigador emérito de Duke University y uno de los mejores amigos de Lefkowitz, recientemente señaló que si hubiera un Premio Nobel por la formación de investigadores, Lefkowitz seguramente lo recibiría.

Con la colaboración de sus distinguidos estudiantes y asociados, particularmente de Marc Caron, con quien ha mantenido una asociación enormemente productiva por muchos años, Lefkowitz logra establecer técnicas que permiten la cuantificación de receptores, la afinidad para agonistas y antagonistas, su relación con la adenilil ciclase y las proteínas G (Alfred G. Gilman y Martin Rodbell, recibieron el Premio Nobel por su trabajo sobre estas proteínas).

Además, su grupo logró el fotomarcaje de los

diversos receptores adrenérgicos y su purificación y reconstitución en membranas artificiales, participando en la definición general de que los receptores son proteínas, muchas de ellas ampliamente glucosiladas.

Cuando realizaba mi posdoctoral con John Fain en Brown University, logramos separar las acciones α_1 de las α_2 -adrenérgicas con base en su señalamiento diferenciado, es decir los receptores α_1 están principalmente asociados al recambio de fosfoinosítidos y a la movilización de calcio intracelular, mientras que los α_2 a la adenililciclasa en forma inhibitoria⁵. Esto fue importante pues indicaba que en realidad había 3 grupos de receptores adrenérgicos por su señalización, pues los beta-adrenérgicos se acoplan a la adenilil ciclase en forma estimulatoria⁵. Para darle más solidez a los hallazgos se hicieron los estudios de asociación de ligandos en colaboración con Lefkowitz y Brian Hoffman, quien era su posdoctoral⁶ y en el caso de los adipocitos humanos también con el grupo del Dr. Burns⁷.

Algunos años más tarde realicé una breve estancia en el laboratorio de Lefkowitz con quien era entonces mi alumno de doctorado, Jose Luis Boyer, para analizar el efecto de la toxina pertussis sobre el estado de afinidad de los receptores α_2 -adrenérgicos⁸, pues Lefkowitz tenía el mejor sistema de análisis de datos para curvas de asociación y competencia de ligandos. Sin duda, estar en el laboratorio de Lefkowitz fue una gran experiencia, se trata de un lugar de altísima intensidad, donde las cosas son para ayer y donde lo importante no es lo que ya hiciste, sino lo que sigue; los seminarios fueron siempre un festival de ideas y proyectos para realizar. Lefkowitz es un investigador inteligente, organizado, disciplinado, de trato amable y muy trabajador. Sin duda un líder que logra conjuntar talentos y voluntades para lograr objetivos bien definidos, que espera avances rápidos y que todo el mundo trabaje, por lo menos, con su misma intensidad.

Volvamos al trabajo de Lefkowitz. A todos estos avances siguió un paso fundamental: la clonación de los receptores. Como puede entenderse, muchos grupos estaban interesados en esto pero no contaban con las estrategias y los elementos necesarios. Aprovechando el receptor beta₂-adrenérgico purifi-



Duke University

Robert Lefkowitz (izquierda) en el laboratorio

cado, el grupo de Lefkowitz, lo proteoliza y obtiene péptidos en suficiente cantidad para obtener anticuerpos que permitieran identificar a la proteína, y lo más importante, la secuencia de aminoácidos de los fragmentos; obtiene la correspondiente secuencia nucleotídica y la sintetiza para utilizar dichos oligonucleótidos en obtener la secuencia codificante. En mayo de 1996 se publica la clonación del gen y el cDNA del receptor beta₂-adrenérgico⁹. Nótese que en este trabajo ya aparece Brian Kobilka, quien fungía como posdoctoral con Lefkowitz; este es el primer trabajo registrado en PubMed de Kobilka. Como se esperaba, este receptor mostró 7 zonas transmembranales y similitud estructural con la rodopsina (**figura 3**). En pocos años el grupo de Lefkowitz se convierte casi completo el pastel de la clonación de los distintos receptores adrenérgicos; solamente se presentaron algunos problemas con la tipificación del receptor α_{1D} y el grupo de Strosberg en Francia les gana la clonación del receptor beta₃¹⁰.

Por supuesto, la clonación no fue el final de nada sino el principio de muchas otras cosas. Utilizando técnicas de biología molecular, se construyeron quimeras (receptores en que una zona se sustituye por la equivalente de otro receptor) con el fin de conocer los dominios funcionales de la proteína y se hicieron mutaciones dirigidas para entender la relevancia de determinados aminoácidos en funciones como: la unión a la adrenalina y a otros agonistas y antagonistas de los diferentes receptores, las zonas de acoplamiento a las proteínas G, sitios de modificación postraduccional (fosforilación, palmitoilación, glucosilación, etc.) y su relevancia funcional.



Duke University

Robert J. Lefkowitz (derecha) con la estudiante Erin Bressler (izquierda)

Los trabajos no ocurren en forma lineal, sino que se unen unos con otros en formas muchas veces insospechadas. Lefkowitz ha tenido desde siempre un gran interés en la regulación de los receptores. La dramática disminución de respuesta (taquifilia/desensibilización) a las aminas adrenérgicas, que se observa después de las primeras dosis en pacientes en estado crítico es un aliciente a la investigación para todos los médicos. La fosforilación del receptor es un evento crítico que regula su función y el grupo de Lefkowitz ha caracterizado y clonado a las principales cinasas participantes. Además ha mostrado que, al igual que en el sistema visual, participan las arrestinas (betaarrestinas) en este proceso. Un hallazgo importante fue mostrar que cuando un receptor se desensibiliza y deja de activar su sistema transductor principal, se prenden otros sistemas de señalamiento, relacionados con proliferación y diferenciación celulares (MAP cinasas). Una contribución muy importante del trabajo de Lefkowitz y otros investigadores sobre la farmacología es definir que los receptores tienen diversos cambios conformacionales que los llevan a diferentes estados de actividad. Ya no se trata del receptor que con la hormona pasa de un estado “apagado” a otro “ prendido”. Hay agentes que hacen que los receptores tomen una de las conformaciones activas pero no otras, es decir que tengan un sesgo en su acción, se denominan “agonistas sesgados” y abren posibilidades terapéuticas pues pueden conducir a un efecto final y no a otros como la haría un agonista no sesgado.

Lefkowitz no ha trabajado exclusivamente con los receptores para la adrenalina. Sí son los receptores que más ha estudiado pero ha aportado conocimiento para muchos otros, principalmente de los acoplados a proteínas G con 7 zonas transmembranales. Este grupo de receptores son los más abundantes en nuestro genoma y blanco de un amplio porcentaje de los medicamentos usados en la práctica clínica. Además, siempre ha tenido un enorme interés en los aspectos cardiovasculares por lo que ha participado en estudios sobre hipertrofia e insuficiencia cardíacas estudiando a los participantes moleculares de la acción de diversas hormonas y neurotransmisores y su rol en estas patologías. Evidentemente no todo lo relevante en el área ha sido hecho por Lefkowitz y su grupo, son muchos los grupos que han permitido avanzar en el conocimiento, como siempre ocurre; sin embargo su liderazgo es incuestionable.

Brian Kobilka es un investigador unos 15 años más joven que Lefkowitz. Yo diría que está en la etapa central de su carrera. Su entrenamiento preuniversitario (Bachelor) fue con énfasis en biología y química. Obtuvo su grado de médico con honores en Yale University School of Medicine y se unió al grupo de Lefkowitz como posdoctoral para, después de algunos años, tomar una posición independiente en Stanford University. A Kobilka lo conozco mucho menos que a Lefkowitz, solamente lo he escuchado en algunos congresos e intercambiado algún saludo. Es un hombre muy delgado, reservado y siempre muy centrado en su trabajo. Como ya mencioné, participó con el grupo de Lefkowitz en la clonación de receptores, en la identificación de dominios funcionales creando quimeras y mutantes puntuales o truncadas y otros muchos aspectos también importantes. Sin embargo su principal contribución como investigador independiente es el estudio detallado del receptor a nivel atómico por técnicas cristalográficas. Al inicio de su carrera independiente combinó estudios funcionales en células y animales *knockout* (en los que se elimina la expresión de un receptor o proteína reguladora) para posteriormente centrarse fundamentalmente en aspectos de estructura. No deja de sorprender que siendo médico haya seleccionado estos aspectos que requieren, no solamente equi-

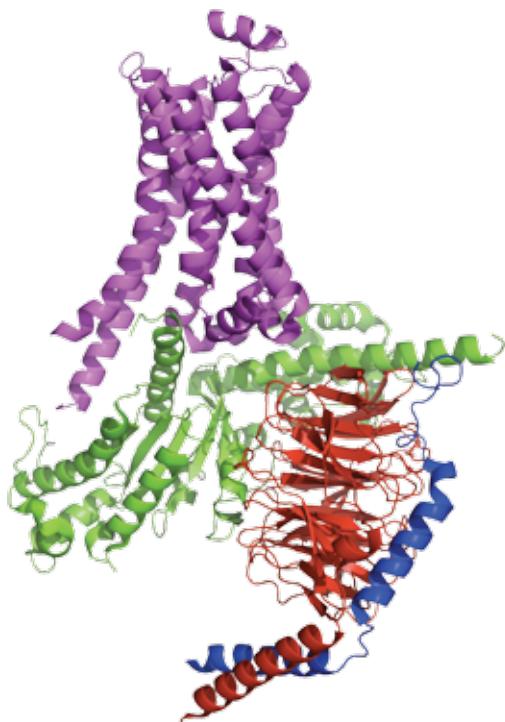


Figura 1. Asociación del receptor con ligandos y proteínas G, desde el punto de vista estructural cristalográfico. Un trabajo totalmente fuera de serie, espectacular.

po muy particular, sino un entrenamiento intenso y enormemente especializado, muy alejado de la práctica médica e incluso de las áreas básicas. Ya al final del siglo XX y los primeros años del XXI estudia cambios conformatacionales en los receptores bajo la acción de agonistas y antagonistas por métodos fluorescentes. Hace solamente 5 años, en 2007, aparecen las primeras publicaciones de la estructura cristalográfica de un receptor de este tipo^{11,12}. En los siguientes años ha estudiado desde el punto de vista estructural cristalográfico la asociación del receptor con ligandos y proteínas G (**figura 1**), además de participar en el estudio cristalográfico de otros receptores, no adrenérgicos. En opinión de los que se dedican a la cristalografía se trata de un trabajo totalmente fuera de serie, espectacular.

No hay duda de que son momentos de gran satisfacción para todos los que trabajamos en el área y estamos seguros de que hay mucho por definir en los próximos años. Felicidades a Robert Lefkowitz y a Brian Kobilka por este reconocimiento a su trabajo. Sin duda, muy merecido.

Modelo de la estructura de un receptor adrenérgico tomado de la página Web del laboratorio de Brian

Kobilka (<http://med.stanford.edu/kobilkalab/>). Se muestra un receptor adrenérgico (en verde; nótense las hélices transmembranales) con su ligando (modelo de volumen, amarillo, rojo, azul) y a la proteína G asociada (subunidad alfa en amarillo, subunidad beta en azul y subunidad gama en magenta). ●

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García-Sáinz JA. Adrenaline and its receptors: one hundred years of research. *Arch Med Res.* 1995;26:205-12.
2. Lefkowitz RJ. Not Necessarily About Receptors. *Clinical Research.* 1983;31:543-9.
3. Lefkowitz RJ, Roth J, Pricer W, Pastan I. ACTH receptors in the adrenal: specific binding of ACTH-125I and its relation to adenyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1970;65:745-52.
4. Lefkowitz RJ, Haber E. A fraction of the ventricular myocardium that has the specificity of the cardiac beta-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971;68:1773-7.
5. Fain JN, García-Sáinz JA. Role of phosphatidylinositol turnover in alpha 1 and of adenylate cyclase inhibition in alpha 2 effects of catecholamines. *Life Sci.* 1980;26: 1183-94.
6. García-Sáinz JA, Hoffman BB, Li SY, Lefkowitz RJ, Fain JN. Role of alpha 1 adrenoceptors in the turnover of phosphatidylinositol and of alpha 2 adrenoceptors in the regulation of cyclic AMP accumulation in hamster adipocytes. *Life Sci.* 1980;27:953-61.
7. Burns T, Langley PE, Terry BE, Bylund DB, Hoffman BB, Tharp MD, Lefkowitz RJ, Garcia-Sainz JA, Fain JN. Pharmacological characterizations of adrenergic receptors in human adipocytes. *J Clin Invest.* 1981;67:467-75.
8. Garcia-Sainz JA, Boyer JL, Michel T, Sawyer D, Stiles GL, Dohlman H, Lefkowitz RJ. Effect of pertussis toxin on alpha 2-adrenoceptors: decreased formation of the high-affinity state for agonists. *FEBS Lett.* 1984;172:95-8.
9. Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, et al. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature.* 1986;321:75-9.
10. Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science.* 1989;245:1118-21.
11. Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science.* 2007;318:1258-65.
12. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.* 2007;450:383-7.