

НОВОСТИ НАУКИ

СТРУКТУРНАЯ ГЕНОМИКА, 2 РАУНД.

По сообщению журнала "Science", том 307, стр. 1554 (2005), Национальный Институт Здоровья (NIH) намеревается продлить стремительно развивающийся проект по структурной биологии еще на пять лет; ученым лишь осталось распределить "сжимающийся" бюджет.

Пять лет назад NIH (Бетезда, Мэриленд, США), запустил грандиозный проект, который некоторые ученые по масштабу и смелости идеи сравнили с проектом "Геном человека" (Human Genome Project). Основная задача этого проекта - получить трехмерные структуры 10000 белков в течение 10 лет. Также, как и проект "Геном человека", эта исследовательская работа, названная Protein Structure Initiative (PSI), может изменить наше представление об основных биологических процессах. В свое время геномный проект вызвал множество споров и разногласий. Проект PSI также расколол научное сообщество структурных биологов. При критически сложившемся в настоящий момент положении дел, разногласия и споры вокруг PSI разгорятся с новой силой.

Приближается окончание "пилотной" стадии проекта: 5 лет исследовательских работ, направленных на разработку технологий, позволяющих модернизировать трудоемкую по-шаговую процедуру в автоматический процесс. В настоящее время проект готов вступить в следующую производственную фазу, названную PSI2. В ближайшее время ожидается, что NIH откроет 3-5 новых центров, каждый из которых получит грантовые отчисления в размере 12 млн. долларов ежегодно для того, чтобы вплотную начать исследование белковых структур. Маленькие научные лаборатории также будут задействованы в решение этих пока трудных проблем: их задачей станет получение белковых структур клеточных мембран. Официальные представители Национального Института общемедицинских наук (NIGMS), который финансирует этот проект, рассматривают предложения о двух типах грантовых отчислений. Ожидается, что уже этим летом будут объявлены победители.

Однако в ходе горячих споров, напоминающих раскол геномного сообщества 10-летней давности, мнения структурных биологов о том, как ускорить процесс, разделились - особенно в свете всеобщей озабоченности по поводу бюджета НИЗ. Основная проблема заключается в массовом производстве: оправдают ли себя существующие технологии, или придется сделать основной упор на разработку более современных методов исследования.

Brian Matthews, ученый-физик из Университета Орегона, председатель внешнего консультативного комитета PSI, утверждает, что сейчас подошло время для каталогизирования тысячи новых белковых структур. По его мнению, такая информация будет широко применяться в биологии и медицине. С ним согласен и Raymond Stevens, структурный биолог из научно-исследовательского института в La Jolla (Калифорния). Однако, по его мнению, рано говорить о массовом производстве структур, на котором планирует сосредоточить все усилия PSI2. Stevens считает преждевременно запускать в работу производственные центры, не имея в наличии улучшенных современных технологий.

И это отнюдь не праздный вопрос. PSI должен определить, является ли основная цель структурной геномики реально достижимой: разработка компьютерных моделей для прогнозирования структуры нового белка из

аминокислотной последовательности. Настоящий проект также должен объяснить взаимодействие белков друг с другом с целью выстраивания основных жизненно важных процессов и помочь исследователям обнаружить новые важные лекарственные мишени.

С одной стороны, ученые, которые планировали проект "Геном человека", справились со своей задачей легко. Секвенирование гена в большей степени основывается на одной технологии: считывание текстов нуклеотидной последовательности в ДНК. Напротив, производство белковых структур требует преодоления девяти отдельных технологических этапов: клонирование "правильного" гена, полное экспрессирование белкового продукта гена в бактериях, его очистка, кристаллизация, отбор лучших кристаллов и их анализ.

Первоначально девять центров, участвующих в пилотной стадии PSI, испытывали определенные трудности, связанные со сложностью процесса. В настоящее время научные лаборатории, занимающиеся структурной геномикой, автоматизировали каждый этап. По словам Matthews, потребовалось несколько лет, чтобы привести все надлежащее оборудование и оснащение в порядок. По мнению ученого, первый этап PSI оказался очень успешным.

Одним из достижений ученых стал робот, которого создали в Центре Структурной Геномики (JCSG) в Сан-Диего, (Калифорния). Он может проводить до 400000 экспериментов в месяц с целью выявления подходящих условий для выращивания высококачественных кристаллов.

Исторически подготовка кристалла к исследованиям представляет собой трудоемкий, долгий процесс. Ученые из калифорнийского Центра Структурной Геномики разработали новые робототехнические системы, позволяющие непрерывно обрабатывать до 96 кристаллов.

По мере прогрессивного развития технологий, возросла производительность научных центров. В течение четвертого года существования проекта PSI ученые получили 350 структур, за первый год эта цифра была намного меньше - всего 77 структур. В этом году в стадии завершения находятся еще 500 структур. Первоначально планировалось производить 10000 структур в течение 10 лет. Новые скоростные технологии позволяют осуществить большинство из намеченных задач проекта, и по мнению исследователей, это - значительный шаг вперед. John Norvell, возглавляющий программу PSI в NIGMS, отмечает важность того, что средняя стоимость каждой структуры значительно снизилась: с 670000 долларов в первом году проекта (инфляция произошла за счет приобретения и установки робототехнического оборудования) до 180000 долларов в четвертом году. По мнению Norvell, в этом году стоимость упадет до 100000 долларов за одну структуру. Он приводит пример: обычные научные структурно-биологические лаборатории тратят около 250000 - 300000 долларов за одну структуру, хотя некоторые исследуемые белки по своему строению гораздо более сложные по сравнению с исходным материалом PSI.

Тем не менее, разновидности белков, исследуемые PSI, представляют собой "яблоко раздора". Научные группы традиционной структурной биологии стремятся избирать для своих исследований однородные белки важных семейств, например, киназы, участвующие во многих биологических проводящих путях. И они часто определяют структуру комплексов одного белка, связанного с различными молекулярными мишенями, для того, чтобы узнать подробности функционирования этого белка. В результате 87% всех структур, хранящихся во всемирной базе данных белков, родственны остальным белкам.

Проект PSI был запущен с целью получить структуры из 40000 различных белковых семейств. 73% структур, которые удалось получить в PSI центрах, поистине уникальны потому, что по меньшей мере 30% нуклеотидной последовательности гена, кодирующего белок, не совпадают с кодирующей последовательностью любого другого белка. Идея проекта состоит в том, чтобы получить структуры из представителей каждого семейства в надежде, что это

поможет компьютерным разработчикам предсказывать структуру других представителей семейства. Полученные данные свидетельствуют о том, что вопреки ожиданиям биологов структурных комбинаций между семействами не так много.

По мнению некоторых структурных биологов, этот научный метод уже потерял свою ценность, и десятки миллионов долларов, поступающие в настоящее время в структурные геномные центры, лучше потратить на традиционные структурные биологические группы. По словам биохимика Thomas Steitz из Йельского Университета, большинство структур, которые произведены в рамках проекта PSI, "не годятся" для понимания процесса жизнедеятельности белков, т.к. они, в свою очередь, не связаны с мишенями. Внимание PSI сосредоточено больше на бактериальных белках, нежели на белках эукариот.

Определенное напряжение между традиционными структурными биологами и структурными геномными группами, безусловно, существует. Некоторые научные центры PSI2 предпочли бы заниматься производством структур белковых комплексов и белков эукариот, тем не менее, структурно-геномная инициатива NIH никогда не ставила для себя цель исследовать однотипную информацию, предоставляемую такой традиционной наукой, как структурная биология. Скорее, основная цель проекта - исследовать пока недостижимые и далекие области "белкового пейзажа". По мнению Berg, на сегодняшний день наиболее важное значение приобретает все-таки структурная геномика, а структурная биология её дополняет.

В рамках проекта PSI ученым уже удалось сделать несколько важнейших открытий. Например, Северо-восточный структурный геномный консорциум (Northeast Structural Genomics Consortium, NESGC) недавно расшифровал структуру белка, который включает метильную группу в рибосомную РНК и придает устойчивость бактерий к антибиотикам. По словам директора NESGC Guy Montelione, эта структура позволила предложить ингибиторы, которые могут восстанавливать эффективность действия определенных антибиотиков и послужить "отправной точкой" для появления отдельной научно-исследовательской программы первостепенного значения. Еще одна структура позволила выявить особенности биологического связывания сигнальной молекулы у растений - салициловой кислоты, ставящей под вопрос традиционное функционирование иммунной системы растений. По словам Montelione, консорциум не только "раскручивает" новую науку, но и новые научные проекты.

Официальные представители NIGMS надеялись поднять существующие PSI центры до уровня полномасштабных производственных фондов и профинансировать еще шесть дополнительных технологических центров, каждый из которых испытывает дефицит денежных средств.

Скудный бюджет NIH вынудил представителей NIGMS пересмотреть эти планы. Они надеялись увеличить текущий бюджет PSI (68 млн. долларов) до 75 млн. долларов в следующем году, т.е. в течение первого года существования PSI 2.

Однако в настоящее время финансирование проекта сократилось до 64,5 млн. долларов. Такое сокращение, по всей видимости, заставит ведущих специалистов в области структурной геномики пересмотреть свои далеко идущие планы, и в конечном итоге, окончание проекта продлится на неопределенный срок. По мнению Brian Matthews, это становится настоящей проблемой.

В результате таких бюджетных сокращений руководителям PSI проекта на следующем этапе будет сложно сбалансировать развитие производства и технологий. Сегодня каждый из существующих пилотных центров получает 8 млн. долларов в год. По словам Norwell, в процессе реализации проекта PSI 2 каждый производственный центр должен был получить по 12 млн. долларов в год. Это означает, что пять научных центров полностью поглотили бы бюджет, рассчитанный на первый год работы PSI 2, при этом на развитие новых технологий осталась бы малая доля денежных средств, о чем в скором времени пришлось бы пожалеть.

Хотя PSI центры увеличили производство белковых структур, "скорость" успешного превращения генов-мишеней в законченные белковые структуры,

по-прежнему, не изменилась. На каждом этапе определения структуры (от клонирования гена до экспрессии белка) ученые сталкиваются с трудностями. Например, только 57% клонированных генов успешно экспрессируют белки, из которых только 28% могут быть очищены. По словам Wilson, это похоже на проведение многоступенчатого химического синтеза. 90% успеха на каждом этапе не гарантирует получение большого количества материала на выходе.

В конечном итоге, PSI центры производят законченные структуры только 2% из 10% белков-мишеней. Учитывая такое низкое процентное соотношение успешных попыток, Stevens утверждает, что во второй фазе проекта необходимо уделить большее внимание развитию технологий. Структурная геномика продвинется далеко вперед только при наличии высокоразвитых современных технологий.

Точку зрения Stevens разделяют не все ученые. По словам Wilson, именно производственные центры, в которые были инвестированы немалые средства, должны приносить доход. По мнению Thomas Terwilliger, биолога из Национальной лаборатории Los Alamos в Нью Мексико и директора TB Structural Genomics Consortium, низкий уровень производительности не является основной проблемой на сегодняшний день - если не удастся получить структуру одного белка из какого-то семейства, ученые смогут найти другой "более плодотворный" белок того же семейства. Новые производственные центры потратят около одной трети своих фондов на совершенствование технологий. Однако Stevens считает, что производство структур - это такой трудоемкий и напряженный процесс, что любые технологические разработки и технологические проекты пока отоходят на второй план.

По мнению Berg, трудно представить финансирование менее трех крупномасштабных производственных центров. Если каждый центр получит по 12 млн. долларов, останется еще 28,5 млн. долларов - более, чем 4 млн. долларов на каждый из шести заявленных технологических центров. Равновесие между производственными и технологическими разработками, по-прежнему, остается очень шатким и, в основном, будет зависеть от грантовых отчислений. Консультативный комитет NIGMS решит, какие центры будут профинансированы в первую очередь, и о своем решении объявит уже в начале июля текущего года.

Сейчас уже можно говорить о том, что при любом исходе проекту PSI не удастся выполнить первоначально намеченные планы - 10000 готовых белковых структур к 2010 году. Учитывая все бюджетные сокращения и технические проблемы, итоговые цифры, вероятно, составят 4000 - 6000; это приблизительное количество структур, которые, по мнению руководителей PSI, понадобятся программистам, чтобы точно предсказать структуры соответствующих членов семейства. Это, по-прежнему, означает, что проект представит готовые структуры только для небольшого числа из известных 40000 белковых семейств. По словам Montelione, для дальнейшего развития производства и технологий потребуется еще один программный цикл, еще пять лет для завершения всех работ. Означает ли это возникновение PSI3? Обсуждение только начинается.

НОВОЕ ЛЕКАРСТВО ПРОТИВ ТУБЕРКУЛЕЗА УСКОРИТ ПРОЦЕСС ВЫЗДОРОВЛЕНИЯ.

Основная причина, в силу которой туберкулез, по-прежнему, остается опасным и распространенным заболеванием во всем мире, заключается в том, что существующие антибиотики необходимо принимать ежедневно в течение длительного времени, что заметно осложняет процесс выздоровления. У пациентов, нерегулярно принимающих препараты, возрастает вероятность появления устойчивых к используемым лекарственным средствам штаммов микобактерии туберкулеза. Новые противотуберкулезные препараты, появившиеся за последние сорок лет, по сути, являются видоизмененными аналогами уже существующих лекарств. В настоящее время исследователи научного центра "Johnson & Johnson" в Бельгии обнаружили соединение, которое может существенно сократить сроки лечения, необходимые для выздоровления. Его действие направлено против штаммов туберкулезной палочки, проявляющих множественную лекарственную устойчивость. По мнению американского ученого и исследователя туберкулеза Jaques Grosset из Университета Джона Хопкина в Балтиморе, это - поистине многообещающая находка.

В журнале "Science" за 2005 г. (том 307, стр. 223-227) опубликовано сообщение группы бельгийских авторов, возглавляемых Andries Koen, (Verhasselt P., Guilleminot J., Gohlmann H.W., Neefs J.M., Winkler H., Van Gestel J., Timmerman P., Zhu M., Lee E., Williams P., de Chaffoy D., Huitric E., Hoffner S., Cambau E., Truffot-Pernot C., Lounis N., Jarlier V.) под названием "A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*". Эта команда исследователей сообщает о проведении крупномасштабных исследований *in vitro* и на мышах, в ходе которых было обнаружено, что новое соединение, названное R207910, более мощное по своему действию, чем все существующие лекарственные препараты, остается дольше в организме и действует гораздо эффективнее. Исследования, проведенные на здоровых добровольцах, и токсикологические исследования на крысах и собаках показывают, что это соединение безопасно. По словам микробиолога Andries Koen, это похоже на осуществление мечты: если вы только пожелаете перечислить все ценные качества, которыми должен обладать противотуберкулезный препарат, их идеальным сочетанием станет новое соединение.

Так же, как и вся остальная фармацевтическая отрасль промышленности, компания "Johnson & Johnson" обладает скромными финансовыми средствами для разработки новых противотуберкулезных препаратов и способов лечения болезни, от которой страдают в основном бедные. Однако, пока исследователи занимались поиском новых антибиотиков широкого действия, ученые компании "Johnson & Johnson" обнаружили, что диарилхинолины эффективны против *M. smegmatis* - микробактерии, родственной возбудителю туберкулеза. Химические манипуляции позволили ученым получить более мощное по своей силе соединение - R207910. На сегодняшний день эта компания финансирует разработку лекарства.

Группа ученых под руководством Andries объединила свои усилия с зарубежными исследовательскими группами для проведения многочисленных экспериментов. В частности, французские ученые разработали необходимую мышиную модель для исследования туберкулеза, в результате чего они обнаружили, что в организме грызунов R207910 действует намного дольше, и предположили, что это соединение и в меньших дозах могло бы уничтожать туберкулезную палочку. Французские ученые включили это лекарство в комбинацию трех наиболее популярных на сегодняшний день препаратов: рифампин, изониазид и пиразинамид. Оказалось, что при этом такой же бактерицидный эффект достигается в два раза быстрее. Различные комбинации с двумя существующими лекарствами также продемонстрировали значительные преимущества.

Как и ожидалось, в процессе монотерапии у мышей развивалась устойчивость к R207910, однако результаты проведенных опытов на мышах убедили ведущих исследователей в области туберкулеза в том, что замена этого препарата на один из трех в данном сочетании остановит развитие устойчивых штаммов и значительно сократит процесс выздоровления. По словам Denis Mitchison из медицинского института при госпитале St. George (Лондон), достигнутые результаты поистине впечатляющие: ученым удалось с помощью комбинации препаратов достичь полной стерилизации органов в течение двух месяцев, а не четырех. Ранее ничего подобного не отмечалось.

Mitchison и некоторые другие исследователи особенно заинтересовались новым механизмом действия препарата. После секвенирования геномов штаммов *M. tuberculosis* и *M. smegmatis*, которые были устойчивы к R207910, Andries и его коллеги сравнили полученные результаты с геномами из наиболее чувствительных штаммов. Генетические мутации, которые они обнаружили в устойчивых штаммах, все указывали на ген, кодирующий фермент, который ответственен за образование АТФ, обеспечивающий клетки энергией. По мнению William Jacobs, ученого из медицинского института им. Альберта Эйнштейна в Нью-Йорке, ранее никому не удавалось идентифицировать таким образом лекарственную мишень для терапии туберкулеза.

По словам Mel Spigelman из некоммерческой организации Global Alliance for TB Drug Development, основанной в Нью Йорке, которая сотрудничает с промышленными и научными кругами с целью прогрессивного развития научно-исследовательских работ для создания быстродействующих лекарственных соединений, R207910 является одним из нескольких новых агентов, действие которых в скором времени будет исследовано на людях. Это своего рода революция в развитии лекарственных препаратов против туберкулеза. Хотя соединение R207910 продвинулось в своем развитии гораздо дальше других новых лекарственных препаратов, по мнению Spigelman, ценность других лекарств может быть доказана в процессе исследований на людях. Spigelman мечтает о том дне, когда новейшие препараты, которые сейчас разрабатываются, будут скомбинированы и станут основой для терапии, позволяющей вылечить туберкулез всего за неделю. Тем не менее, важнейшей проблемой наряду с разработкой новых препаратов является их распространение по приемлемым ценам - это основная задача Global Alliance, который, возможно, будет сотрудничать с компанией "Johnson & Johnson" в будущем.

По словам Andries, компания J&J прекрасно понимает, что большинство из 8 миллионов людей, страдающих от туберкулеза каждый год, не могут позволить себе дорогостоящие лекарства. Основным стимулом для ученых остается острая медицинская необходимость в создании такого лекарственного соединения. Andries признает, что наименьшая часть финансовых средств будет возмещена компании за счет добровольных пожертвований. В скором будущем лекарство будет испытано на людях с активными формами туберкулеза. Многие перспективные лекарства не оправдывают своего назначения в процессе исследований на людях, однако по мнению Andries, при благополучном исходе новое лекарственное соединение появится на рынке через пять лет.

Материал подготовлен при участии Рыженковой О.Н.