

НОВОСТИ НАУКИ

В протеомике необходимо изменение основного принципа (парадигмы): “структура определяет функцию” следует заменить на “связывание определяет функцию”

Многочисленные данные по секвенированию ДНК и визуализации трехмерной структуры биомолекул породили новую традицию в исследованиях по молекулярной биологии, согласно которой все биологические процессы можно понять путем установления биологических структур. Это привело к доминирующей в научном мире парадигме: *структура определяет функцию* и распространенным ожиданиям того, что в будущем лекарства и вакцины будут разрабатываться скорее путем рациональных структурных расчетов, а не путем эмпирических испытаний. Первостепенное значение структуры для объяснения биологических процессов явилось результатом некоторой двусмысленности и недопонимания природы взаимоотношений между структурой и функцией биомолекул.

До сих пор остается неясным, какой аспект структуры молекулы должен рассматриваться при анализе взаимоотношений структура - функция. Поскольку общность трехмерных структур белков всегда консервативнее аминокислотной последовательности, вполне объясним тот факт, что члены белкового семейства, у которых идентичность при секвенировании составляет не более 10-30%, имеют структуры, практически "накладываемые" друг на друга. Аминокислотные остатки, необходимые для поддержания укладки белков, а также отвечающие за функциональную активность, высоко консервативны. [1]. Тем не менее, поскольку белки во время эволюции постепенно теряют некоторые функции и приобретают новые, так называемые "функциональные" остатки не всегда сохраняются, даже если укладка белка остается прежней. В таком случае укладка белка не коррелирует с сохранением функции.

Ещё одна трудность при анализе взаимоотношений между структурой и функцией заключается в том, что индивидуальные белки обычно выполняют сразу несколько функций. Установлено, что белки в среднем способны взаимодействовать по крайней мере с пятью партнерами при помощи различных участков связывания.

Еще одна двусмысленность заключается в самом понятии - *функция*. Этот термин используется в разных смыслах и возможное соотношение со структурой будет зависеть от рассматриваемого аспекта функции и уровня биологической организации. Биохимиков интересует молекулярный уровень, они рассматривают в основном следующие типы активности: связывание, катализ, передача сигналов. Во многих случаях, единственный обсуждаемый тип активности - связывание, а функция уже рассматривается как синоним к понятию связывание. Функции также могут определяться на уровне клетки и организма, и в данном случае они значимы только в отношении определенной биологической системы, её выживания, воспроизводства, жизнедеятельности.

Функции белка могут быть охарактеризованы по трем основным классам, в зависимости от той биологической роли, которую они играют в организме: энергетические-, информационные- и коммуникационные [1, 2]. Взаимосвязь между биологической ролью и структурой белка менее очевидна, чем между связыванием и структурой, поскольку эти функции являются следствием обобщенных взаимодействий многих индивидуальных белков и макромолекулярных групп.

Основной принцип - структура определяет функцию - часто интерпретируется как причинно-следственные отношения между структурой и функцией. Хотя биологическая активность всегда напрямую зависит от определяющей физической структуры, сама структура фактически не влияет на преобладание той или иной активности. Причинно-следственные отношения представляют собой результат последовательных событий, а не отношения между двумя материальными объектами или между структурой и событием. Биологическое событие, такое как реакция связывания, не может быть обусловлено ничем иным, кроме как структурой одного или обоих взаимодействующих партнеров [3].

Также невозможно установить происхождение связывающей активности на основе структуры одной из взаимодействующих молекул, если сначала не идентифицированы определенные взаимоотношения с конкретным партнером. Это происходит потому, что участок связывания представляет собой некоторое единство, определяемое взаимодействующим партнером, а не внутренними структурными особенностями, которые можно идентифицировать и без помощи конкретного лиганда. В отличие от структуры молекулы структуру участка связывания нельзя рассматривать без связывающего партнера [3].

И поскольку структура не определяет функцию, попытка анализа взаимоотношений "структура - функция" должна заключаться в поиске взаимосвязи, а не причинно-следственных отношений. При отсутствии необходимой связи между структурой белка и его активностью любые попытки прогнозировать биологические функции *de novo* и *in silico*, по-прежнему, остаются достаточно рискованными. Предсказать те или иные функции представляется вполне возможным, сравнивая последовательность или структуру белков известной и неизвестной функции. Однако достоверность подобных прогнозов, основанных на структурных сравнениях, уменьшается по мере увеличивающегося несходства между двумя белками. Во многих случаях, гомологичные исследования лишь причисляют белок к широкому функциональному классу [4].

Прогнозирование сворачивания белка на примере последовательности оказывается на 60-70% достоверным, что не удивительно, ввиду огромного разнообразия последовательностей, которые обуславливают одну и ту же укладку белка. Очевидно, что нет четкой взаимосвязи между последовательностью и структурой белка, и мы обладаем недостаточными знаниями о взаимоотношениях между структурой участка связывания и сродством связывания лиганда для трансляции структурной информации и последующего достоверного прогнозирования энергии связывания. Эта неспособность предсказывать сродство связывания на основе структурной информации обусловлено отчасти недостаточным разрешением большинства структурных данных, трудностью объяснения сольватации и др. Несмотря на достижения в области биоинформатики и химиоинформатики, достоверную информацию о структурах, функциях и свойствах вероятнее всего получить экспериментальным путем, а не полагаться на алгоритмы прогнозирования.

Биологическая активность белка всегда вовлекает процесс молекулярного распознавания, который напрямую зависит от первоначального специфического связывания с лигандом. Поэтому, важнейшим критерием в оценке биологической активности становится способность белка к специфическому связыванию. Поскольку основная задача протеомики - определить взаимодействия и активность всех белков, экспрессированных в клетке, можно ожидать более широкое использование анализа связывания в протеомных исследованиях. Также широко используется анализ двугибридной системы дрожжей, однако он способен обнаружить достаточно ограниченное количество всевозможных взаимодействий [5, 6].

В последние годы биосенсорные инструменты, использующие принцип поверхностного плазмонного резонанса, стали все более популярными для измерения характеристик связывания биомолекул. Очень популярен биосенсор BIACORE [7-9].

Этот прибор измеряет связывание между лигандом, иммобилизованным на чипе и спектрометре, анализируемым веществом, введенным в протекающий по его поверхности раствор. Сейчас разрабатываются более мощные версии подобных инструментов, что значительно облегчит сбор необходимых протеомных данных. Главное преимущество этого метода заключается в том, что все измерения осуществляются в режиме реального времени, что позволяет определить точную кинетическую константу [10, 11]. В многих случаях - это константа скорости диссоциации, которая является важнейшим параметром, контролирующим "присутствие" "полезной" функции, легко измеряемой биосенсором.

Поскольку биологическая активность белка обычно зависит от правильной третичной структуры, биосенсорные измерения связывания, чувствительные к конформационной целостности белка, особенно ценны с точки зрения выявления активных молекул. Хотя физико-химические технологии (хроматография, электрофорез и спектроскопия) обычно используются для характеристики белков и контроля любой степени деградации молекулы или протеолиза, эти аналитические методики позволяют оценить только химический состав, первичную и вторичную структуру белков и не указывают, являются ли исследуемые молекулы биологически активными.

С другой стороны, когда концентрацию белка измеряют по его способности особым образом взаимодействовать с лигандом в биосенсоре, это биологически активная концентрация, а не просто количество химического вещества, которое может включать и правильно, и неправильно свернутые молекулы. При использовании биосенсоров для измерения активной концентрации белков обычно обнаруживают, что активная концентрация намного ниже номинальной концентрации, выявляемой обычными физико-химическими методами [12]. Поэтому необходимо более широкое использование биосенсоров для измерения концентрации биомолекул. Другое главное преимущество измерения активной концентрации при помощи технологии биосенсора в том, что этот метод позволяет измерять концентрацию белка без подготовки и очистки.

Присутствие биологической активности в препарате белка также может быть продемонстрировано биологическими испытаниями *in vitro* и *in vivo*, однако они гораздо менее точные и трудновоспроизводимые, нежели биосенсорные измерения. Поскольку биологическая активность лиганда и функция обязательно подразумевают первый этап связывания между лигандом и правильно свернутой молекулой белка, биосенсорные исследования, которые, в свою очередь, основываются на специфическом связывании лиганда - полезный метод для определения количества биологически активных белков по сравнению с другими исследованиями. Вероятно, именно поэтому анализ связывания станет стандартным методом оценки функции белка в протеомных исследованиях. Представляется вполне возможным идентифицировать белки, способные участвовать в биологически значимом взаимодействии, объединив анализ биомолекулярного взаимодействия (при помощи биосенсора) с масс-спектрометрией [13, 14].

Анализ связывания также необходим для определения, какие из аминокислотных остатков на участке связывания вносят вклад в энергию взаимодействия. Обычная методика предлагает модифицировать белок путём направленного мутагенеза или аланинового сканирования и оценить эффект мутаций на сродство к связыванию. Такие исследования всегда выявляют наличие "горячих точек" на участках связывания, соответствующих нескольким аминокислотным остаткам, которые вносят основной вклад в энергию связывания [15, 16]. Это означает, что так называемый функциональный участок связывания всегда меньше, чем структурный участок связывания, характеризующийся остатками, которые контактируют с лигандом. Поэтому структура и функциональная активность участка связывания должны всегда рассматриваться как единое целое.

Поскольку функции белка лучше выявляются путем биосенсорного анализа связывания, чем структурным прогнозом, по всей видимости, функциональная протеомика только выиграет от замены основного принципа - *структура определяет функцию* на *связывание определяет функцию*. Вместо многочисленных попыток установить точную функцию неохарактеризованных белков, структурное прогнозирование могло бы оказаться гораздо полезнее для отбора генных продуктов, которые должны быть исследованы путем анализа связывания на основе структуры, совместимой с наличием возможной функции.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Patty L.* (1999) Protein Evolution. Blackwell Science: Oxford.
2. *Tamames J., Ouzounis C., Sander C., Valencia A.* (1996) Genomes with distinct function composition. FEBS Lett., **389**, 96-101.
3. *Van Regenmortel M.H.V.* (2002) Reductionism and the search for structure-function relationships in antibody molecules. J. Mol. Recognit., **15**, 240-247.
4. *Fields S.* (1997) The future is function. Nat. Genet., **15**, 325-327.
5. *Ito T., Tashiro K., Muta S., Ozawa T., Chiba T., Nishizawa M., Yamamoto K., Kuhara S., Sakaki Y.* (2000) Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: a comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. Proc. Natl Acad. Sci. USA, **97**, 1143-1147.
6. *Rain J.C., Selig L., De Reuse H., Battalia V., Reverdy C., Simon S., Lenzen G., Petel F., Wojcik J., Schachter V., Chemana Y., Labigne A., Legrain P.* (2001) The protein-protein interaction map of Helicobacter pylori. Nature, **409**, 211-215.
7. *Myszka D.G.* (1999) Survey of the 1998 optical biosensor literature. J. Mol. Recognit., **12**, 390-408.
8. *Rich R.L., Myszka D.G.* (2000) Survey of the 1999 surface plasmon resonance biosensor literature. J. Mol. Recognit., **13**, 388-407.
9. *Rich R.L., Myszka D.G.* (2001) Survey of the year 2000 commercial optical biosensor literature. J. Mol. Recognit., **14**, 273-294.
10. *Day Y.S., Baird C.L., Rich R.L., Myszka D.G.* (2002) Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic and rate constants determined by surface and solution based biophysical methods. Protein Sci., **11**, 1017-1025.
11. *Медведева Н.В., Ипатова О.М., Иванов Ю.Д., Дрожжин А.И., Арчаков А.И.* (2006) Биомедицинская химия, **52**, 529-546.
12. *Zeder-Lutz G., Benito A., Van Regenmortel M.H.V.* (1999) Active concentration measurements of recombinant biomolecules using biosensor technology. J. Mol. Recognit., **12**, 300-309.
13. *Natsume T., Nakayama H., Isobe T.* (2001) BIA-MS-MS: biomolecular interaction analysis for functional proteomics. Trends Biotechnol., **19**, 528-533.
14. *Nedelkov D., Nelson R.W.* (2001) Biomolecular interaction analysis mass spectrometry. Proteomics, **1**, 1441-1446.
15. *Jin L., Wells J.A.* (1996) Mutational analysis of antibody binding sites. In Structure of Antigens, Vol. 3, Van Regenmortel MHV (ed.). CRC Press: New York; 21-36.
16. *DeLano W.L.* (2002) Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. Curr. Opin. Struct. Biol., **12**, 14-20.

"Лекарственная" реформа. Готовы ли к ней развитые страны?

Непрекращающиеся споры по всему миру относительно высокой стоимости лекарств стали предметом обсуждения на заседании Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) в Женеве. Руководство рассмотрело два предложения с целью объединить усилия по развитию медицинских научных исследований и разработок.

ВОЗ вынуждена решать две прямо противоположных проблемы, заключающиеся в следующем: международная система интеллектуальной собственности руководит распределением лекарственных средств, в то же время существует острая нехватка доступных, эффективных лекарств для населения в бедных странах.

Развитые страны - особенно США - в прошлом уже сталкивались с подобными резко противоположными заявлениями, рассматривая их как вмешательство и прямую угрозу для фармацевтической промышленности. Впервые такие вопросы поднимает ВОЗ, и сторонники реформ настроены оптимистично. Многие полагают, что последние события - массированная растущая стоимость здравоохранения в США, дефицит лекарственных препаратов против птичьего гриппа, недостаток необходимых контрмер против таких заболеваний, как сибирская язва - убеждают западный мир в том, что существующая система не отвечает всем потребностям здравоохранения.

Первое предложение, которое предстоит рассмотреть исполнительному комитету ВОЗ, поступило от Кении и Бразилии с просьбой принять соответствующие меры по разработке новых лекарственных препаратов. Необходимость реформ стала результатом растущего беспокойства относительно нехватки лекарств, вакцин и диагностических продуктов для заболеваний, особенно распространенных в развивающихся странах. Например, по данным одного исследования, лекарства против туберкулеза и тропических заболеваний типа малярии, поступившие на рынок с 1975 по 1999 год, составили только 1% [1]. Остальные 99% - лекарства против заболеваний, более соответствующих развитому миру: онкологических и сердечно-сосудистых.

Однако развитые страны также страдают от нехватки новых лекарственных препаратов. Большая часть новых лекарств - лишь слабое видоизменение уже существующих препаратов. По словам Tim Hubbard, биолога из Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge, UK), что-то действительно должно измениться в ближайшем будущем. Каждому понятно, что затраты на исследования с каждым годом возрастают, а число новых лекарств, поступающих на рынок, сокращается.

Многочисленные группы потребителей, активистов, ученых поддержали это предложение. Сторонники реформ предлагают различные варианты решения вопроса: создать международный фонд для более тщательного исследования тех или иных заболеваний или учредить специальную премию для ученых, разрабатывающих инновационные лекарства.

ВОЗ обязуется заняться решением этой проблемы всерьез. По словам Ellen't Hoen (Médecins Sans Frontières, Geneva), пришлось приложить немало усилий, чтобы заинтересовать руководство ВОЗ этим вопросом.

ВОЗ должна рассмотреть вопрос о патентном праве: действительно ли существующие законы ограничивают доступ к необходимым медикаментам. Согласно докладу ВОЗ от 3 апреля 2006 года, патентная система работает недостаточно в области инновационных лекарств, необходимых в развивающихся странах. ВОЗ приводит 50 рекомендаций к действию.

Предложения рассмотрены на заседании ВОЗ в мае 2006 года. Развитые страны пока не проявляют четкой позиции в отношении реформ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Trouiller P., Olliaro P., Torreele E., Orbinski J., Laing R., Ford R.* (2002) Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet*, **359**(9324), 2188-2194.

По материалам журналов "Journal of Medical Recognition" и "Nature"
при участии Рыженковой О.Н.