

TRANSLATION  
"Structural Genomics, Round 2"

**Science, 11 Marca 2005**

**Robert Service**

## **Druga runda genomiki strukturalnej**

**Ambitne plany Amerykańskiego Departamentu Zdrowia związane z pięcioletnim programem rozwoju biologii strukturalnej na tle ciągnącego się sporu pracowników naukowych o malejące fundusze.**

Niespełna pięć lat temu, pokonując wiele trudności, Amerykański Departament Zdrowia z Bethesda podjął wyzwanie stworzenia programu badawczego, który niektórzy porównywali rozmiarem i stopniem trudności do Human Genome Project (Projekt poznania ludzkiego genomu). Głównym jego celem było zebranie w ciągu dekady struktur przestrzennych 10 000 białek. Tak jak i Human Genome Project, nowy plan, nazwany Protein Structure Initiative (PSI), miał zmienić nasze wyobrażenie o przebiegu wielu podstawowych procesów biologicznych. Nowe przedsięwzięcie również prowokowało dyskusje i debaty, dokonując nawet podziału w świecie naukowym, a obecnie znajdując się w krytycznej fazie, wzniesła jeszcze gorętsze spory.

Dobiega właśnie końca pięcioletni okres pilotażowy, mający za zadanie znaleźć rozwiązania technologiczne umożliwiające zamianę pracochłonnych i powolnych metod na lepsze, bardziej wydajne oraz mające zastosowanie w badaniach na masową skalę. Projekt obecnie szykuje się do wejścia w fazę produkcji, zwaną PSI 2. W ciągu kilku miesięcy Departament ma wyznaczyć trzy do pięciu placówek badawczych, z których

każda otrzymać ma 12 milionów dolarów rocznie na modelowanie sporych ilości białek z niespotykaną dotąd szybkością. Departament zleci także opracowanie nierozwiązanych dotąd problemów ( np. uzyskiwanie struktur białek wbudowanych w błony komórkowe) kilku mniejszym laboratoriom. Przedstawiciele National Institute of General Medical Sciences (NIGMS), które finansuje cały program, rozpatrują obecnie zgłoszenia na dwa rodzaje grantów, w lecie natomiast ogłoszone zostaną ostateczne wyniki konkursu.

Obecna debata, mimo podobieństw do tej sprzed dziesięciu laty, spolaryzowała środowisko biologii strukturalnej w kontekście szybkości postępu w badaniach, który należy mieć na uwadze z powodu ograniczonego budżetu Departamentu. Najtrudniejsza jest odpowiedź na pytanie, czy technologia jest już dostatecznie rozwinięta, aby sprostać przejściu do fazy masowej produkcji, czy też poczekać, i skupić należy się na dalszych udoskonaleniach technologicznych. Prezes Protein Structure Initiative, zarazem fizyk na University of Oregon, Brian Matthews, przekonuje, że nadszedł czas na dalsze badania i rozpoczęcie katalogowania tysięcy nowych struktur. Jak twierdzi, „dane z pewnością będą miały szerokie zastosowanie w biologii i medycynie”. Z kolei Raymond Stevens, biolog z Scripps Research Institute z La Jolla, zgadzając się z opinią, że „uzyskana jak dotąd technologia jest rzeczywiście imponująca”, jednocześnie podchodzi z dystansem do przewidywanej w PSI 2 możliwości wytwarzania struktur białek na masową skalę. Uważa również, że „powinniśmy wstrzymać się z uruchomieniem nowych centrów badawczych dopóki nie pojawią się lepsze technologie”.

Nie są to jałowe dyskusje. W rzeczywistości program może umożliwić poznanie odpowiedzi na największą zagadkę genomiki strukturalnej – czy możliwe jest komputerowe generowanie poprawnych struktur trzeciorzędowych z łańcuchów aminokwasów. Możliwe również, iż rzuci on nowe światło na to, jak białka oddziałują między sobą, tworząc podstawowe procesy życiowe, oraz pomogą naukowcom tworzyć nowe leki.

## **Zwiększanie obrotów**

Twórcy Human Genome Project mieli prostsze zadanie z jednego względu – sekwencjonowanie genów opiera się w dużej mierze na wykorzystaniu jednej technologii – odczytywaniu sekwencji nukleotydowych z DNA. Z kolei odtwarzanie struktur trzeciorzędowych wymaga dopracowania dziewięciu osobnych metod badawczych: powielanie wybranego genu, stosowanie ekspresji genu w bakterii, oczyszczanie, transformowanie do struktury kryształu, selekcjonowanie kryształów najlepszej jakości, poddawanie ich promieniowaniu rtg w synchrotronie, zapisywanie wyników analizy dyfrakcyjnej oraz wykorzystanie zebranych danych do modelowania poprawnych struktur białek.

Dziewięć centrów badawczych uczestniczących w fazie pilotażowej PSI miało początkowo spore trudności z tak złożonym procesem, jednak zespoły genomików strukturalnych poradziły sobie z tym problemem, automatyzując każdy etap badań. Jak twierdzi Brian Matthews, „zdobycie całego sprzętu zabrało im kilka dobrych lat, jednak myślę, że pierwszą fazę badań można uznać za sukces”.

Wśród usprawnień znalazł się nowy, tworzony w Joint Center for Structural Genomics (JCSG) w San Diego, robot zdolny do przeprowadzania miesięcznie 400 000 eksperymentów mających na celu wybranie najlepszych warunków do łączenia białek w kryształy wysokiej jakości. Robotykę zastosowano również w synchrotronach. Przygotowywanie kryształów do pomiarów od zawsze było żmudnym procesem, wymagającym godzin dostrajania. Obecnie zespół badawczy m.in. z JCSG przygotował

system robotów całkowicie automatyzujący tą pracę, umożliwiając jednorazowo wytworzenie do 96 kryształów. Biolog strukturalny z Scripps Research Institute i zarazem szef JCSG, Ian Wilson, uważa to za wielkie osiągnięcie.

Wraz z ulepszeniem techniki, centra badawcze uzyskują wyniki coraz szybciej. W czwartym roku działalności PSI osiągnęło 350 struktur trzeciorzędowych, co stanowi sporą poprawę w porównaniu z pierwszym rokiem, gdy uzyskało ich jedynie 77. W tym roku uzyska około 500. Tak duże tempo niestety nadal nie wystarczy, aby osiągnąć pierwotnie zamierzony wynik 10 000 struktur w ciągu dekady, co przyznają nawet przedstawiciele PSI, uznając pierwotny cel jako przesadnie optymistyczny. Mimo wszystko, całe przedsięwzięcie jest sporym krokiem naprzód i powinno przynieść całkiem obiecujące wyniki. Co równie istotne, jak zauważa kierownik PSI John Norvell, nastąpił ogromny spadek kosztu odnalezienia pojedynczej struktury – z 670 tys. dolarów, do 180 tys w czwartym roku programu. Norvell spodziewa się, że cena spadnie w tym roku nawet do 100 tys dolarów za białko. Dla porównania, metody stosowane przez badaczy do tej pory uzyskiwały wynik 250 do 300 tys dolarów za strukturę, chociaż należy zauważyć, iż często zajmowali się o wiele bardziej skomplikowanymi białkami niż PSI.

Rodzaj białek poddawanych analizie w programie jest jednak kością niezgody między naukowcami. Tradycyjne badania w dziedzinie biologii strukturalnej skierowane były na podobne białka z ważniejszych grup, takich jak kinezy, biorących udział w ważniejszych drogach przemian biologicznych. Popularna praktyką było również badanie struktur pojedynczych białek złączonych z innymi molekułami w celu lepszego poznania ich funkcji, przez co obecnie w największych bazach białek 87% struktur jest blisko spokrewnionych ze strukturami innych białek.

PSI zostało stworzone w celu uzyskania tak wielu struktur jak to tylko możliwe, ze zbioru około 40 000 różnych grup białek. W istocie, daje to wyniki – aż 73% struktur uzyskanych w centrach naukowych programu zostało zakwalifikowane jako unikalne, co oznacza, że przynajmniej 30% sekwencji genów kodujących dane białko nie powtarza się w kodzie żadnego innego. Celem strategii zdobywania struktur z wielu różnych grup białek jest stworzenie modeli komputerowych zdolnych do przewidywania struktur trzeciorzędowych pozostałych członków badanych grup. Już dzisiaj zebrane informacje pozwalają nam stwierdzić, że różnice w budowie białek pomiędzy różnymi grupami nie są tak duże, jak początkowo przewidywali biolodzy.

Z drugiej strony, niektórzy twierdzą, że tego typu podejście jest mało wartościowe, na dodatekma ograniczone zastosowanie, a miliony dolarów tłoczonych w centra badawcze z pewnością zostałyby lepiej wykorzystane przy tradycyjnych badaniach. Thomas Steitz, biochemik z Yale, uważa, że większość uzyskanych przez PSI struktur białek jest bezużyteczna w badaniach nad funkcjonowaniem białek, ponieważ nie były one połączone z żadnymi innymi obiektami biologicznymi, a na dodatek cały program skupia się na badaniu białek bakteryjnych, a nie eukariotycznych.

Jak przyznaje Berg, rzeczywiście „istnieje napięcie” między biologami strukturalnymi, a nowymi grupami genomików strukturalnych. Co prawda, niektóre centra badawcze w drugiej fazie programu będą zajmować się bardziej złożonymi białkami, oraz tymi pochodzenia eukariotycznego, to jednak celem całego projektu nigdy nie było zdobywanie informacji tego samego typu, co w tradycyjnej biologii strukturalnej, tylko raczej dotarcie do niezbadanych dotąd zakamarków proteinowego świata. Dodaje też, że „w jego opinii najważniejszy jest fakt, iż strukturalna genomika i biologia współdziałają, i potrafią świetnie się uzupełniać”.

Berg wraz z innymi pracownikami zauważa też, że PSI miał już spory wkład w biologię, np. Northeast Structural Genomice Consortium (NESGC) niedawno uzyskało

strukturę dodając grupę metylową do RNA rybosomalnego jednocześnie nadając bakteriom odporność antybiotykową. Dyrektor konsorcjum NESGC, Guy Montelione, uważa, że umożliwi to uzyskanie nowych związków blokujących mogących wiele wnieść do produkcji antybiotyków, co ostatecznie poskutkowało wydzieleniem osobnego programu badawczego. Z kolei inna struktura uzyskana w tym samym centrum badawczym, umożliwiła odkrycie szczegółów, w jaki sposób rośliny wiążą molekuly sygnałowe zwane kwasem ortohydroksybenzoesowym (salicylowym) stawiając pod znakiem zapytania obecną wiedzę o funkcjonowaniu systemów odpornościowych roślin! Montelione podsumowuje odkrycia, twierdząc, że „nie tylko wyłaniamy nowoczesną dziedzinę nauki, ale zapoczątkowujemy też zupełnie nowe inicjatywy”.

## Rozdział drugi

Przyszłość projektu podlega jednak dyskusji. Przedstawiciele NIGMS mieli w planach rozszerzyć działalność obecnie prosperujących centrów badawczych umożliwiając im masową produkcję, oraz ufundować sześć nowych ośrodków naukowych mających zajmować się bieżącymi problemami przedsięwzięcia. Kurczący się budżet zmusił niestety NIGMS do zrewidowania planów. Przyszłoroczne fundusze szacowano na 68 do 75 milionów dolarów, jednak obecna sytuacja zmusiła do rozważenia jedynie 64 dolarów wsparcia. Obniżka prawdopodobnie zmusi zespoły badawcze do utemperowania ambitnych planów, co ostatecznie może doprowadzić do wydłużenia całego projektu.

Powstałe cięcia budżetowe utrudnią również szefostwu PSI wybór między produkcją, a rozwojem technologicznym w dalszej części programu. Każde z istniejących centrów badawczych dostaje 8 milionów dolarów rocznie, natomiast w planach drugiej fazy było zwiększenie tej kwoty do 12 milionów, co w kontekście problemów finansowych oznacza, że jednoroczny budżet zostałby wykorzystany przez zaledwie pięć centrów badawczych, zostawiając luki w rozwoju technologicznym. Jak twierdzi Stevens, „a tego możemy bardzo żałować za pięć lat”.

Stevens wskazuje również na nadal nierozwiązane problemy techniczne, jak np. fakt, iż pomimo coraz większej liczby wyników w każdym z centrów, prawdopodobieństwo znalezienia struktury białka z danego genu pozostaje właściwie bez zmian. Na każdym etapie procesu odgadywania struktury, na naukowców czeka sporo problemów. Jedynie 57% klonowanych genów zostaje poprawnie eskpresjonowane na białka, a spośród nich jedynie 28% może zostać oczyszczone. Wreszcie, jedynie 2% do 10% białek udaje się opisać poprawną strukturą trzeciorzędową. W obliczu tak małej skuteczności całego procesu, Stevens nakłania do większego rozwoju technologicznego w czasie fazy PSI 2, dodając, że „strukturalną genomikę będzie czekał znaczny postęp, jeśli tylko pozwolimy rozwinąć się odpowiednim technologiom”.

Niewielu współpracowników pana Stevensa podziela to zdanie. Wilson powtarza, że „powinniśmy oczywiście skupić się na centrach produkcyjnych, w które przecież już tyle zainwestowaliśmy”, z kolei Thomas Terwilliger, biolog strukturalny z Los Alamos National Laboratory i szef TB Structural Genomice Consortium, dodaje, że umiarkowana skuteczność procesu produkcyjnego nie jest dużym problemem, ponieważ nawet jeśli białko z danej grupy nie daje poprawnej struktury, zawsze można poszukać innego, bardziej skłonnego do współpracy. Poza tym, pan Montelione wskazuje na fakt, że nowe centra produkcyjne przeznaczają aż jedna trzecia środków na rozwój. Co więcej, Stevens przewiduje tak wielki popyt na produkowane struktury białek, że wszelkie kwestie technologiczne niepotrzebnie mogą odciągać uwagę od samych struktur.

Berg przyznaje, że trudno sobie wyobrazić utworzenie mniej niż trzech dobrych centrów produkcyjnych, jednak z 12 milionowym budżetem na każde z nich, pozostaje

nadal prawie 28,5 milionów dolarów – po ponad 4 miliony na każde z sześciu proponowanych centrów technologicznych. Stosunek produkcji do rozwoju nie jest jeszcze znany i będzie zależał w dużej mierze od ocen przedstawionych propozycji. Rada NIGMS zdecyduje w maju, na które centra przeznaczyć fundusze, wyniki ogłoszone zostaną jednak dopiero na początku lipca.

Niezależnie od wyniku, jest mało prawdopodobne, żeby projekt PSI osiągnął pierwotnie zamierzony cel wyznaczenia 10 000 struktur trzeciorzędowych do roku 2010. Przez cięcia budżetowe i stale ujawniające się wyzwania technologiczne, końcowy wynik będzie wynosił prawdopodobnie między 4 000 a 6 000, co według szacunków powinno wystarczyć do wyznaczenia struktur spokrewnionych białek. Niestety, oznacza to również, że wyniki będą dostępne jedynie dla małej części z 40 000 grup białek. Jak twierdzi Montelione, „obecna kompozycja produkcji i rozwoju technologicznego będzie potrzebować kolejnych 5 lat, aby osiągnąć stawiane cele”. Tak więc, czy doczekamy PSI 3? Dyskusja dopiero się zaczyna.