

НАУКА ДЛЯ ОБЩЕСТВА

Магнитный резонанс поможет изучить рак и гепатит С

Новосибирский институт органической химии СО РАН получил грант РФФИ на исследование структуры и функций белков и нуклеиновых кислот с помощью магнитного резонанса. Результаты этой работы помогут понять молекулярные механизмы, лежащие в основе онкологии молочной железы и гепатита С, и разработать подходы к созданию новых лекарств от этих болезней, а также позволят усовершенствовать методологию научных исследований



д.ф.-м.н. Елена Григорьевна Багрянская

Проект объединил сотрудников Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и Международного томографического центра СО РАН.

«Наша работа направлена на решение трех задач: поиск молекулярной мишени в РНК вируса гепатита С, изучение структуры лактапина (фрагмента каппа-казеина женского молока, способного вызвать гибель клеток рака молочной железы человека) и разработку новых подходов к исследованию белков и нуклеиновых кислот. Все эти темы объединены общей методологией: ядерным (ЯМР) и электронным магнитным резонансом (ЭПР)», — рассказывает руководитель проекта, врио директора НИОХ СО РАН д.ф.-м.н. Елена Григорьевна Багрянская.

Гепатит С и супер-злодей IRES

«Одним из перспективных приложений ЭПР-спектроскопии в молекулярной биологии является изучение пространственной организации функциональных РНК-белковых комплексов, структуру которых сложно определить другими методами, такими как рентгеноструктурный анализ или криоэлектронная микроскопия. Знания об их строении позволяют глубже понять механизмы разнообразных клеточных процессов, обеспечивающих нашу жизнедеятельность», — говорит заведующая лабораторией структуры и функции рибосом ИХБФМ СО РАН д.х.н. Галина Георгиевна Карпова.



д.х.н. Галина Георгиевна Карпова

РНК вируса гепатита С содержит в своем составе один специфический структурный элемент — так называемый IRES, благодаря которому вирус при проникновении в клетку подчиняет ее трансляционный аппарат, чтобы синтезировать собственные белки. Он делает это путем связывания IRES с малой субчастицей рибосомы, отвечающей за начальные стадии синтеза.

Сегодня частично известны молекулярные механизмы этого процесса. В лаборатории структуры и функции рибосом показано, что связывание IRES вызывает в субчастице внутренние перестройки, благодаря которым она становится способной участвовать в инициации трансляции вирусной РНК. При этом происходят изменения и в самом IRES. То есть его структура в изолированном виде сильно отличается от той, которую он приобретает в результате связывания с малой субчастицей рибосомы. Более того, установлены даже участки IRES, отвечающие за эти перестройки. Однако до конца этот процесс пока не понят. Прояснить его можно было бы с помощью рентгеноструктурного анализа или криоэлектронной микроскопии. Однако оба эти метода имеют свои ограничения — первый требует обязательной кристаллизации изучаемого объекта (но не все биологические структуры легко ей поддаются). Второй, хотя и достиг уже достаточно высокого уровня разрешения, не позволяет увидеть конкретные нуклеотиды рибосомной РНК и IRES, участвующие в перестройках.

«Отчасти эта проблема могла бы быть решена с помощью ЭПР-спектроскопии. Так, измеряя расстояния между различными участками IRES в составе его комплексов с малой субчастицей рибосомы и сравнивая их с расстояниями между теми же участками IRES в его изолированном состоянии, мы узнали бы, каким образом изменяется структура этого элемента на начальной стадии трансляции вирусной РНК. Такая информация, в свою очередь, дала бы нам возможность выбрать подходящие мишени для направленного воздействия на последнюю, чтобы блокировать ее трансляцию на стадии инициации», — утверждает Галина Георгиевна.

Такого рода исследование требует вводить спиновые метки не в одно положение IRES, а сразу в несколько. Это нетривиальная научная задача, поскольку ни один из известных к настоящему времени подходов не позволяет внедрять их в длинные структурированные РНК, которые соответствовали бы природным РНК или хотя бы их фрагментам.

В лаборатории структуры и функции рибосом ИХБФМ СО РАН разработан метод сайт-направленного введения спиновых меток, позволяющий сделать это. Идея сибирских ученых такова: сначала в заданное положение РНК вводится аминокислотный линкер — специальное ароматическое соединение, ковалентно связанное с определенным ДНК-олигомером. Последний легко удаляется, и это приводит к высвобождению аминокислотной группы в остатке, оказавшемся присоединенным к РНК в результате ее модификации. По ней затем селективно вводится необходимая метка.

«Сайт-направленно вводить спиновые метки в IRES намного сложнее, чем, например, фотоактивируемые, которые используют для мечения участков рибосомы, где связываются конкретные нуклеотиды IRES. Эта сложность вызвана тем, что для измерения расстояния между

различными участками IRES спиновые метки должны быть присоединены к нему одновременно по двум заданным положениям, — отмечает сотрудница ИХБФМ СО РАН к.х.н. Елена Сергеевна Бабайлова, непосредственно занимающаяся введением меток в IRES. — Эта задача может быть решена путем последовательного комплементарно-адресованного алкилирования РНК — то есть сначала нужно провести модификацию по одному участку, затем — по другому».

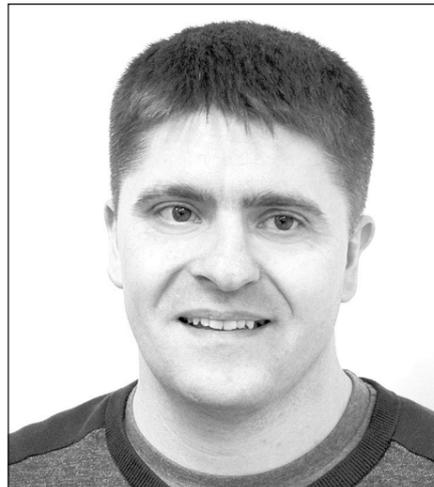


к.х.н. Елена Сергеевна Бабайлова

Производные, полученные таким способом, оказались пригодными для ЭПР-исследований. «Еще одной находкой проекта было то, что в модельные РНК мы ввели спиновые метки на основе стереозамещенных нитроксильных радикалов имидазолинового ряда, синтезированные в лаборатории азотистых соединений НИОХ СО РАН к.х.н. Игорем Анатольевичем Кирилюком и его коллегами. Как оказалось, эти метки имеют свойства, которые позволяют проводить измерения не при традиционных гелевых температурах, а при более высоких — до 150 К. Полученные результаты были представлены в Японии, Швейцарии и Франции в качестве пленарных докладов на международных конференциях. Ученые, занимающиеся применением ЭПР к исследованию РНК, проявили к нему огромный интерес», — отмечает Елена Григорьевна Багрянская.

Рак и добрый лактапин

Вторая задача интеграционного проекта сибирских ученых — исследование структуры лактапина (не так давно открытого в лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН под руковод-



к.х.н. Александр Сергеевич Фомин

ством к.б.н. Владимира Александровича Рихтера фрагмента каппа-казеина молока человека, способного вызвать гибель клеток рака молочной железы) и его генно-инженерного аналога — лактапина RL2, также показавшего эффективность в торможении опухолевых процессов. Сделать это с помощью стандартных подходов невозможно — белок не поддается кристаллизации, поэтому в проекте планируется применить современные методы ядерного и электронного резонанса (ЯМР и ЭПР).

«Информация о структуре лактапина позволит понять механизм его действия на молекулярном уровне. В дальнейшем на основе полученных знаний можно будет создать эффективный противоопухолевый препарат», — утверждает научный сотрудник лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН к.х.н. Александр Сергеевич Фомин.

Для изучения лактапина методом ЯМР необходимо было получить его рекомбинантный аналог, обогащенный по изотопам атомов азота N15 и углерода C13. При исследовании методом ЭПР стояла задача химически модифицировать структуру этого фрагмента, введя спиновую метку в несколько положений полипептидной цепи. На сегодняшний день ученым уже удалось получить почти все необходимые образцы. Сейчас вместе с коллегами из МТЦ СО РАН и НИОХ СО РАН они изучают спектры ЯМР лактапина.



к.х.н. Андрей Владимирович Шернюков

«Метод ЯМР позволяет исследовать белки и другие биологические объекты без введения дополнительных химических групп. Однако объем информации, содержащийся в получаемых спектрах, оказывается очень большим. Поэтому для более точной их расшифровки используют дополнительные данные о структуре белка, извлекаемые другими способами, например, ЭПР, — рассказывает сотрудник лаборатории магнитного резонанса НИОХ СО РАН к.х.н. Андрей Владимирович Шернюков. — Сделать это помогает методология по сайт-направленному введению спиновых меток. Сначала с ее помощью измеряется расстояние между конкретными участками белка. Затем эти данные вводятся в программу молекулярного моделирования, и на выходе получается готовая структура, на основании которой можно предсказать спектр ЯМР. По нему уже гораздо проще и быстрее найти решения, и они получаются более точными». В дальнейшем ученые также планируют изучать структуру лактапина с помощью ядерного резонанса.

(Окончание на стр. 7)