

# **ПРОТЕОМИКА**

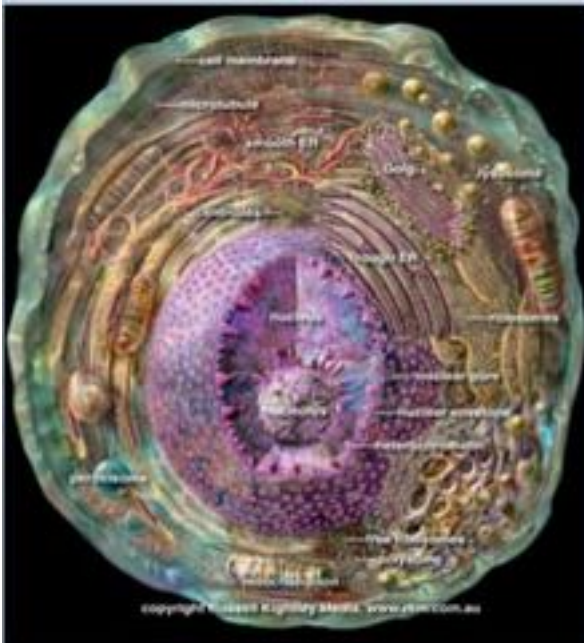
*по своей сути – это определенная часть функциональной геномики*

- 1. Проект «Протеом человека»**
- 2. Структурная протеомика**
- 3. Функциональная протеомика**
- 4. Практическая протеомика**

• Термин «протеомика» (от *протеин* и *геномика*) появился в научной печати в 1995 г. для определения направления биологической науки, которое посвящено изучению *протеома*.

англ. *PROTEOME: entire PROTEin complement expressed by genOME*

• В широком смысле под протеомом подразумевают полный набор белков, которые могут быть синтезированы в течение всей жизни клетки.



• В узком смысле – это совокупность белков, которые экспрессируются геномом данной клетки в определенный момент времени.

Число белков в одной клетке:

- Высокоэкспрессируемые:  $10^5 - 10^6$
- Умеренно экспрессируемые:  $10^3 - 10^4$
- Слабоэкспрессируемые:  $10^1 - 10^2$

В отличие от биохимии и иммунохимии, которые ориентированы на последовательное изучение отдельных белков, в протеомике используется системный подход и учитывается параллельно весь спектр белков, составляющих определенную систему и характеризующих исследуемый организм в целом.

### Химия белка

vs

### Протеомика

•Индивидуальный белок



Сложная смесь

•Полная последовательность



Частичная последовательность

•Структура и функция



Идентификация

•Структурная биология



Системная биология

# Традиционные методы, используемые в областях

## Химия белка

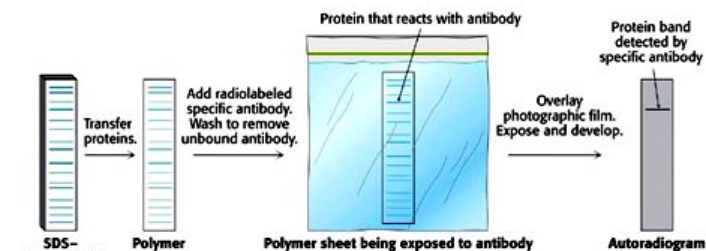
vs

## Протеомика

**Иммуноферментный анализ (ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)**

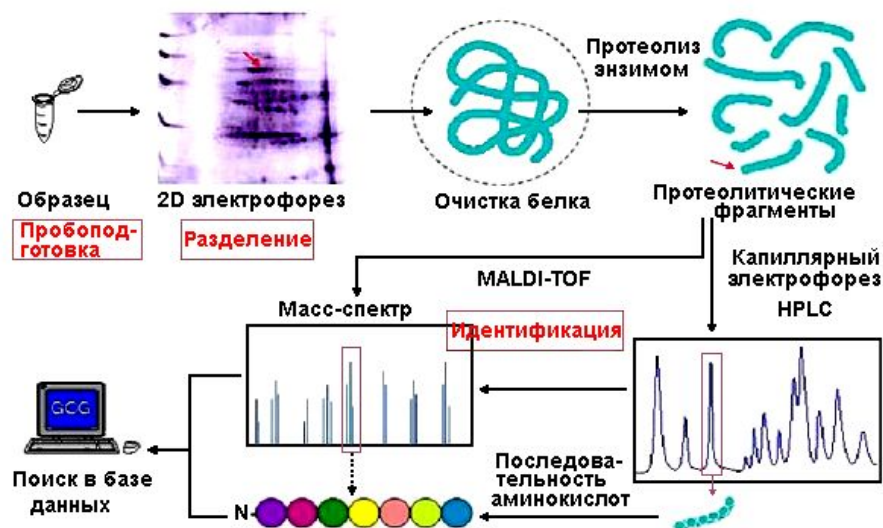


**Иммуноблоттинг (или Вестерн-блоттинг, англ. Western-blotting)**



Western Blots

**2D-PAGE электрофорез + Масс-спектрометрия + биоинформатика**



## Почему надо исследовать протеом?

- ❑ в процессе геномных исследований были выявлены многие новые гены, кодирующие белки с неизвестными функциями;
- ❑ нет корреляции между наборами мРНК и белков;
- ❑ модификации белков не могут быть выведены из нуклеотидной последовательности;
- ❑ белки обладают разнообразными пространственными структурами, которые на сегодняшний день нельзя определить по линейным последовательностям нуклеотидов и даже аминокислот.
- ❑ каждая клетка, каждая ткань, каждая биологическая жидкость имеют собственный спектр белков, или, так называемую, *протеомную карту*, которая меняется в соответствии с состоянием клетки.
- ❑ многие заболевания могут быть прослежены до изменений, происходящих на уровне белков, а до 96 % лекарственных средств воздействуют именно на белки.

# От генома к протеому



После геномики и транскриптомики, протеомика — следующий шаг в изучении биологических систем. Протеомика объективно сложнее геномики, так как геном организма в большинстве случаев не меняется в ходе жизни, но совокупность всех его белков изменяется постоянно.

Геномика

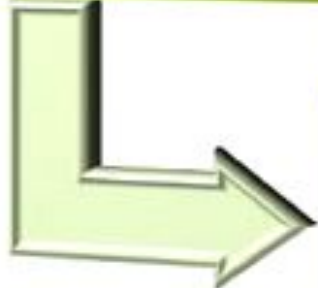
• Что возможно

В 2001 г. Международный консорциум ученых, политиков и бизнесменов создал организацию **HUPO** (*Human Proteom Organization*), которая руководит международным проектом «**Протеом человека**». (<http://www.hupo.org/>)



Транскриптомика

• Что вероятно



Протеомика

• Что действительно происходит

В отличие от предыдущего проекта **HUGO** (*Human Genome Organization*) – проект HUPO не имеет четко обозначенных сроков.

# Цель и задачи протеомики

**Конечная цель протеомики** – установление и характеристика полного набора белков данного организма, в первую очередь создание атласа белков человека (англ. *HPA, Human Protein Atlas*).

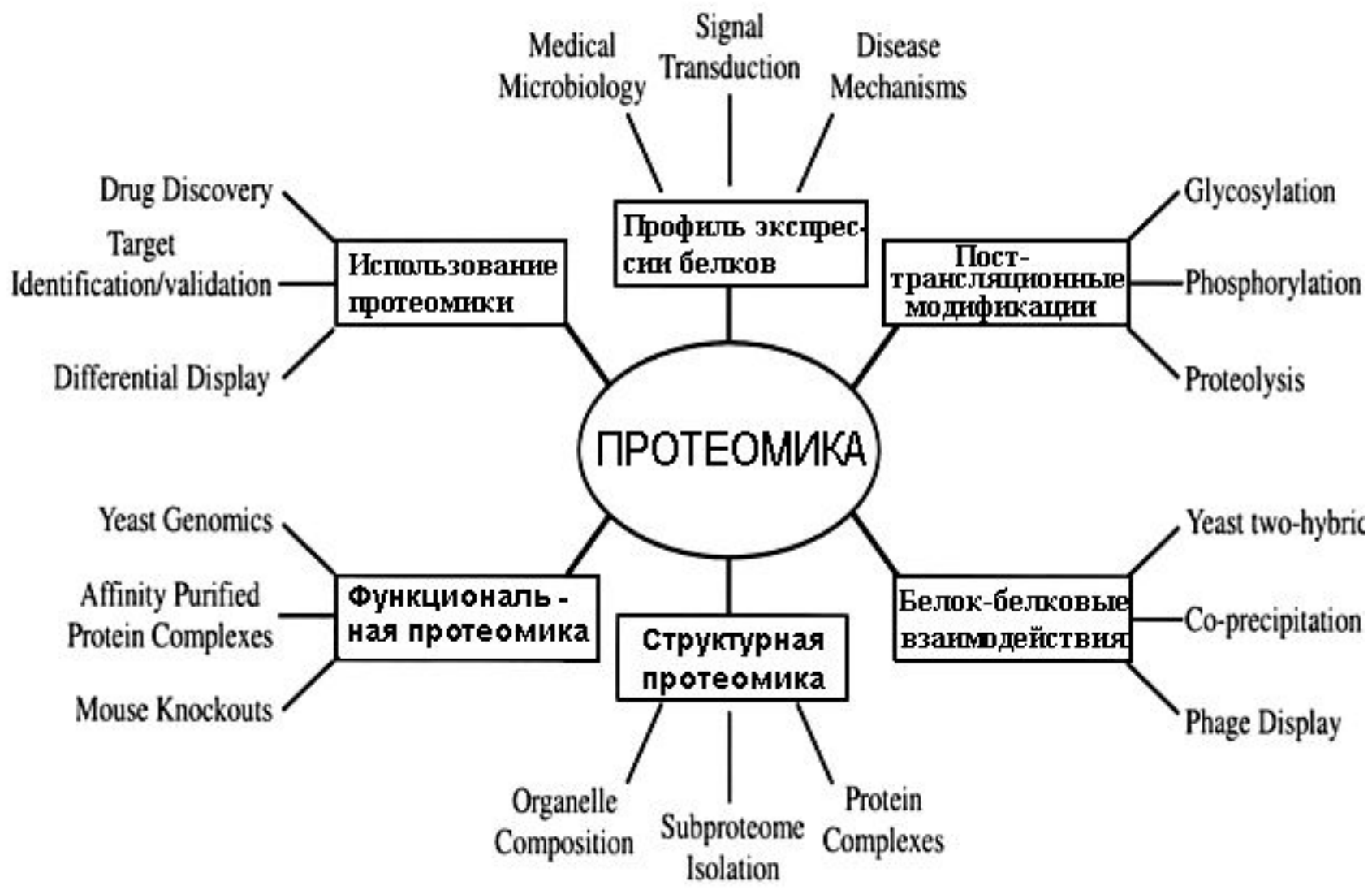
## Основные задачи протеомики:

- ❖ идентификация белков клеток, тканей, биологических жидкостей организма;
- ❖ определение структуры белков;
- ❖ установление функциональных свойств белков;
- ❖ исследование взаимосвязи структуры и функции белков;
- ❖ выяснение механизмов регуляции активности белков;
- ❖ изучение межбелковых взаимодействий (совокупность всех биологически значимых взаимодействий белков в клетке называют *интерактомом*);
- ❖ выяснение специфики изменений протеома при заболеваниях;
- ❖ выявление белков – мишеней, на которые направлено действие лекарственного средства.



# Основные направления в протеомике

- Структурная протеомика – занимается инвентаризацией белков, их пространственной структурой и посттрансляционными модификациями;
- Функциональная протеомика – изучает функции и свойства белков, взаимодействия белков между собой, взаимодействие структуры и функции;
- Практическая (экспрессионная) протеомика – изучает уровни экспрессии белков в норме и патологии, ориентирована на создание новых лекарственных препаратов, в которых молекулярными мишенями будут служить те или иные белки.



# Общие подходы к получению информации о молекулах белков и их взаимодействиях:

## 1. Биоинформатический (*in silico*)

Высокопроизводительное изучение белков стало возможным только в постгеномную эпоху, то есть при наличии известных нуклеотидных последовательностей геномов разных организмов.

Первый Атлас белковых последовательностей и структур (*Atlas of Protein Sequence and Structure*) выпускался в 1965-78 гг. под редакцией Маргарет О. Дэйхофф.



В 1971 г. основана база данных макромолекулярных биологических объектов – Protein Data Bank (**PDB** – <http://www.rcsb.org/pdb>, или проще <http://www.pdb.org>).



Первый международный белковый информационный ресурс – Protein Information Resource, **PIR** (<http://pir.georgetown.edu/>) – был создан в 1984 г.

# Основные центры протеомной биоинформатики



Швейцарский институт биоинформатики (**SIB**, *Swiss Institute of Bioinformatic*) <http://www.isb-sib.ch/>



Европейский институт биоинформатики (**EBI**, *European Bioinformatics Institute*) <http://www.ebi.ac.uk/>



Европейская лаборатория молекулярной биологии (**EMBL**, *European Molecular Biology Laboratory, отдел EBI*) <http://www.embl.de/>



Национальный центр биотехнологической информации (**NCBI**, *National Center for Biotechnology Information*) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>



Японская международная база белковых данных (**JIPID**, *Japan International Protein Information Database*) <http://www.ddbj.nig.ac.jp>

Мюнхенский информационный центр белковых последовательностей (**MIPS**, *Munich Information Center for Protein Sequence*) <http://mips.helmholtz-muenchen.de>



**UniProt** (Universal Protein Resource) — Всемирная база данных белковых последовательностей и функций создана в 2002 г.  
(<http://www.uniprot.org/>)



**UniRef**  
кластеры  
UniRef100  
UniRef90  
UniRef50



UniProt – самый полный в мире каталог информации о белках. Статистические данные можно найти на сайте:  
<http://web.expasy.org/docs/relnotes/relstat.html>.

**UniMES**  
образцы последовательностей метабенома и окружающей среды

**UniParc - архив**  
современные и устаревшие последовательности

**EMBL/GenBank/DDBJ.Ensembl** и другие ресурсы последовательностей

## Программное обеспечение работ с протеомными базами данных позволяет достаточно быстро и эффективно:

- транслировать нуклеотидную последовательность (ДНК/РНК) в последовательность аминокислот белка;
- вычислять физико-химические параметры белка, исходя только из аминокислотной последовательности;
- предсказывать продукты расщепления протеазами; предсказывать гидрофобные, гидрофильные участки: например, трансмембранные сегменты; посттрансляционные модификации (PTM); *мотивы* и функциональные *домены*;
- определять принадлежность белка к функциональным семействам;
- делать заключения на основе выравнивания последовательностей белков об их эволюционном происхождении

и многое другое.

# Доступ к научным базам данных и программное обеспечение (т. е. *ресурсы*) в различных областях науки о жизни, включая протеомику, можно получить на Биоинформационном портале ресурсов (*SIB, Bioinformatics Resource Portal*) **ExPASy** (<http://www.expasy.org/proteomics>).

The screenshot displays the ExPASy website interface. At the top, there is a browser address bar showing the URL [www.expasy.org](http://www.expasy.org) and the page title "ExPASy: SIB Bioinformatics Resource Portal - Categories". The website header includes the SIB and ExPASy logos, the text "Bioinformatics Resource Portal", and navigation links for "Home", "About", and "Contact". A search bar is located below the header, with the text "Query all databases" and a "search" button.

The main content area is divided into several sections:

- Visual Guidance** (red button)
- Categories** (red button)
- proteomics** (grey button) with a list of sub-categories: protein sequences and identification, mass spectrometry and 2-DE data, protein characterisation and function, families, patterns and profiles, post-translational modification, protein structure, protein-protein interaction, and similarity search/alignment.
- genomics** (grey button)
- structural bioinformatics** (grey button)
- systems biology** (grey button)
- phylogeny/evolution** (grey button)
- population genetics** (grey button)
- transcriptomics** (grey button)
- biophysics** (grey button)
- imaging** (grey button)
- IT infrastructure** (grey button)
- drug design** (grey button)
- Resources A..Z** (red button)
- Links/Documentation** (red button)

The **SIB resources** section includes a checkbox for "External resources - (No support from the ExPASy Team)".

The **Databases** section lists various resources with "more" links:

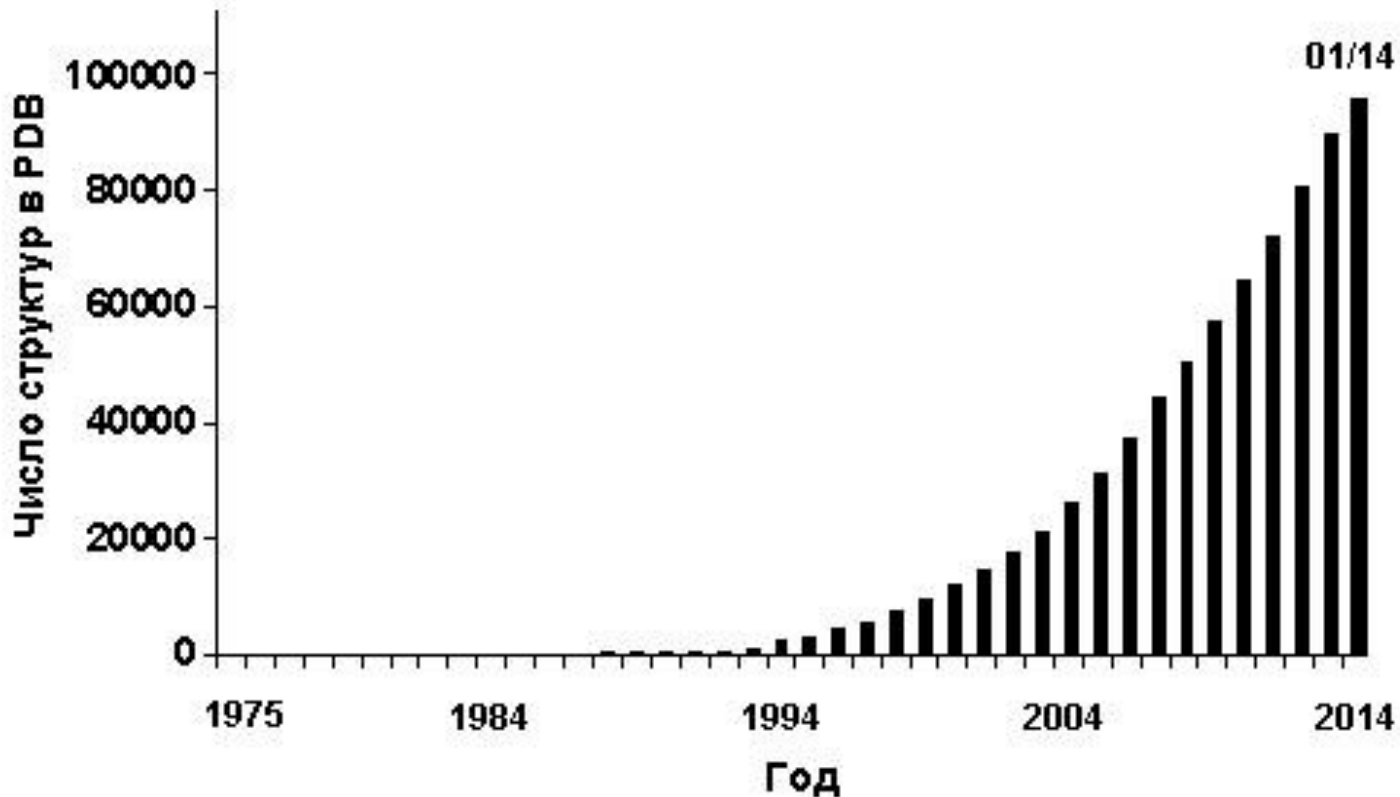
- neXtProt • human proteins • [more]
- PROSITE • protein domains and families • [more]
- STRING • protein-protein interactions • [more]
- SWISS-MODEL Repository • protein structure homology models • [more]
- UniProtKB • functional information on proteins • [more]
- UniProtKB/Swiss-Prot • protein sequence database • [more]
- ViralZone • portal to viral UniProtKB entries • [more]
- EMBLnet services • bioinformatics tools, databases and courses • [more]
- ENZYME • enzyme nomenclature • [more]
- GPSDB • gene and protein synonyms • [more]
- HAMAP • UniProtKB family classification and annotation • [more]
- MetaNetX • Metabolic Network Repository & Analysis • [more]
- MIAPEGeIDB • MIAPE document edition • [more]
- MyHits • protein domains database and tools • [more]
- PANDITplus • protein families and domains resources • [more]
- PaxDb • protein abundance database • [more]
- Prolune • Popular science articles (in French) • [more]
- Protein Model Portal • structural information for a protein • [more]
- Protein Spotlight • Informally written reviews on proteins • [more]
- SugarBind • pathogen sugar-binding • [more]
- SWISS-2DPAGE • proteins on 2-D and SDS PAGE maps • [more]
- SwissSidechain • non-natural amino-acid sidechains • [more]
- SwissVar • variants in UniProtKB entries • [more]
- TCS • interaction specificity in two-component systems • [more]
- UniCarbKB • curated glycan database • [more]
- UniMES (UniProt metagenomic samples) • UniProt Metagenomic and Environmental Sequences • [more]
- UniParc (UniProt sequence archive) • UniProt sequence

The **Tools** section lists various software tools with "more" links:

- SWISS-MODEL Workspace • structure homology-modeling • [more]
- SwissDock • protein ligand docking server • [more]
- 2ZIP • Prediction of leucine zipper domains • [more]
- 3o5 • find user-defined patterns in protein sequences • [more]
- AACompldent • protein identification by aa composition • [more]
- AACompSim • amino acid composition comparison • [more]
- Agadir • Prediction of the helical content of peptides • [more]
- ALF • simulation of genome evolution • [more]
- Alignment tools • Four tools for multiple alignments • [more]
- AlIAI • protein sequences comparisons • [more]
- APSSP • Advanced Protein Secondary Structure Prediction • [more]
- Ascalaph • Molecular modeling software • [more]
- big-PI • predict GPI modification sites • [more]
- Biochemical Pathways • Biochemical Pathways • [more]
- BLAST • sequence similarity search • [more]
- BLAST (UniProt) • BLAST search on the UniProt web site • [more]
- BLAST - NCBI • Biological sequence similarity search • [more]
- BLAST - PBIL • BLAST search on protein sequence databases • [more]
- Blast2Fasta • Blast to Fasta conversion • [more]
- boxshade • MSA pretty printer • [more]
- CFSSP • Protein secondary structure prediction • [more]
- ChloroP • chloroplast transit peptides & cleavage sites • [more]
- Click2Drug • Directory of computational drug design tools • [more]
- ClustalO (UniProt) • Align two or more protein sequences • [more]
- ClustalW • Multiple sequence alignment • [more]
- ClustalW - PBIL • Multiple sequence alignment program • [more]
- ClustalW2 • Multiple sequence alignment program • [more]

# Динамика поступления сведений о белковых структурах в PDB

([http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=general\\_information/pdb\\_statistics/index.html](http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=general_information/pdb_statistics/index.html))



Темпы экспериментально доказательной характеристики открытых белков сильно отстают от темпов открытия новых последовательностей, осуществляемых путём предсказания на основе вычислительных методов.



# Общие подходы к получению информации о молекулах белков и их взаимодействиях:

## 2. Экспериментальный (*in vivo* и *in vitro*):

Новые технологии после завершения международного проекта «Геном человека» принято называть *постгеномными*.

Широкий спектр методов: разные виды электрофореза, хроматографии, масс-спектрометрии, криоэлектронной и конфокальной микроскопии, методы иммунохимического, рентгеноструктурного и ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопии), микрочиповые технологии, биосенсорные технологии и многие другие.

# Структурная протеомика

**Цель** — идентификация полного набора белков организма и установление их структуры.

## **Конкретные задачи:**

- 1) *выделение и очистка белков протеома;*
- 2) *определение количества того или иного белка в образце;*
- 3) *идентификация белков протеома;*
- 4) *уточнение их первичной структуры;*
- 5) *определение посттрансляционных модификаций и внутримолекулярной динамики белков (вторичной и третичной структур).*

# **1. Выделение белков протеома (пробоподготовка)**

требуется проведения следующих операций:

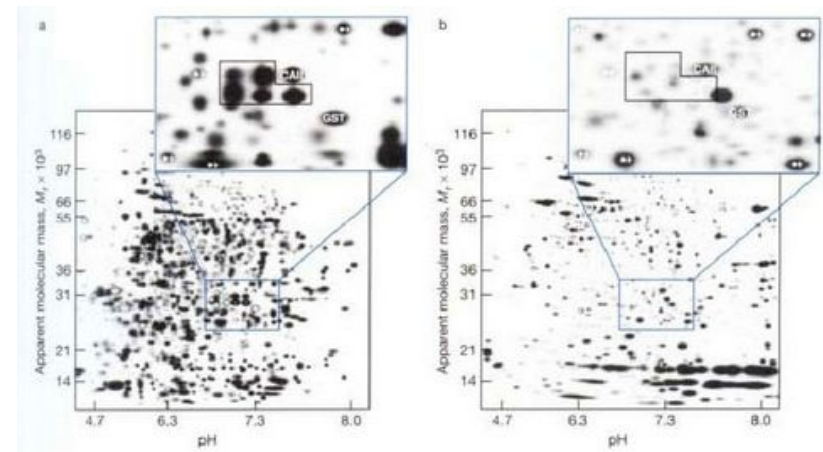
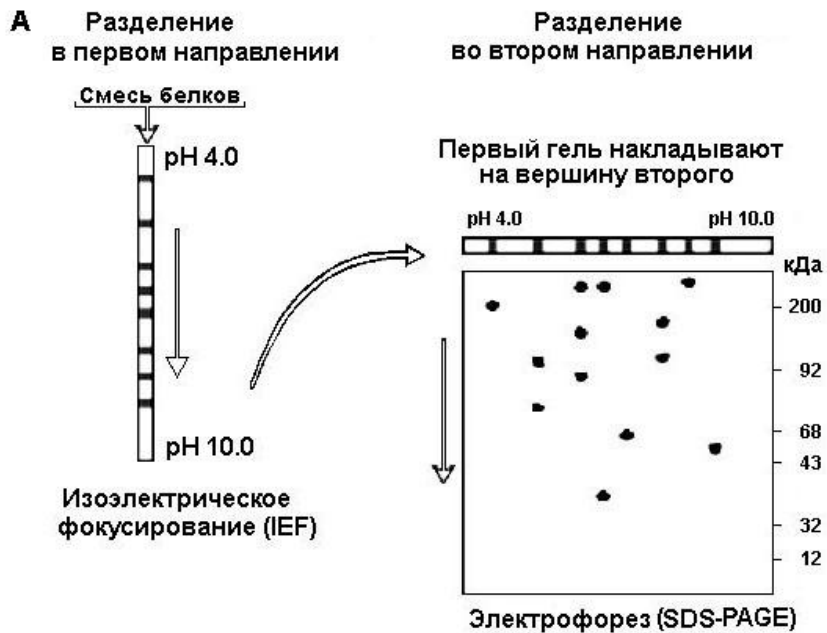
- разрушение первоначальной структуры биологического материала;
- предотвращение любой ложной деградации аналита (т. е. белков);
- удаление веществ, которые могут препятствовать дальнейшей обработке образца, например, разделению белков, химической маркировке или контролируемому перевару (расщеплению ферментами);
- поддержание белков в растворенном состоянии в условиях и средах, соответствующих дальнейшей обработке.

*Процесс пробоподготовки является критическим для качества конечного результата протеомного анализа и зависит от многих параметров.*

## 2. Разделение белков протеома

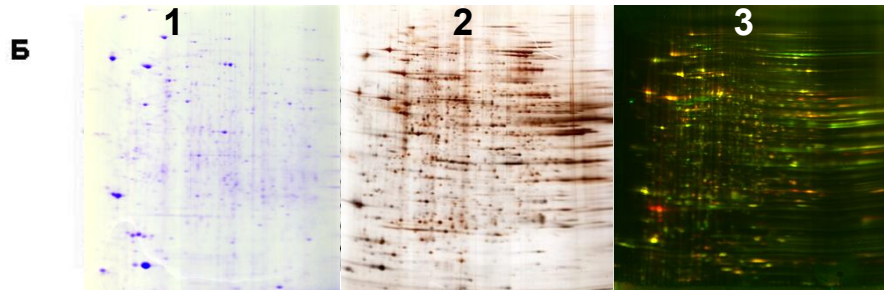
Для задач протеомики наиболее адекватными из всех методов разделения белков оказались:

а) **двумерный денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле** (англ. *2D-PAGE*, *2-Dimension PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) и

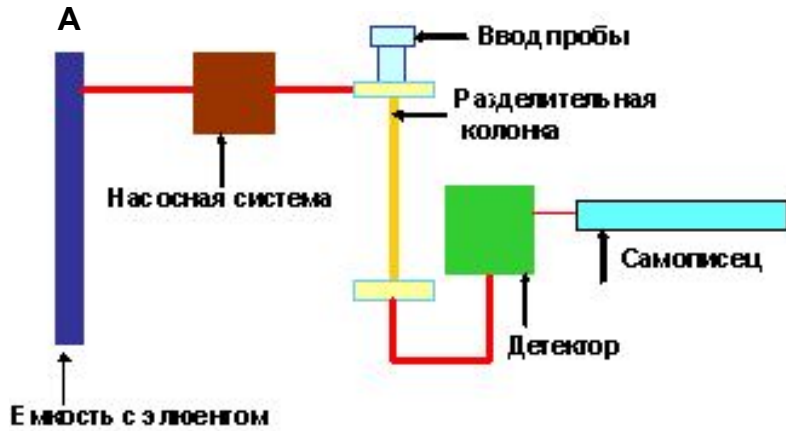


**Схема 2D-PAGE электрофореза: (А),** методы окраски гелей и количественный анализ 2D-электрофореграмм;

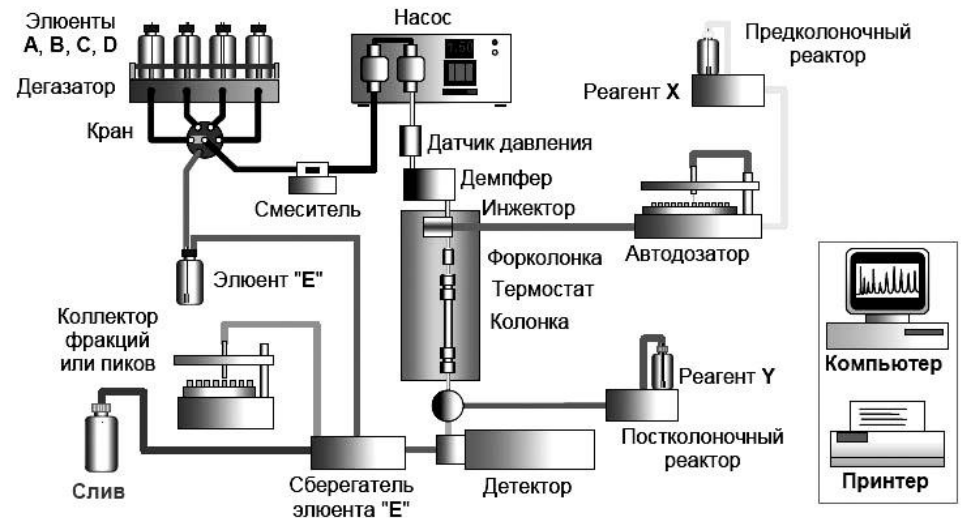
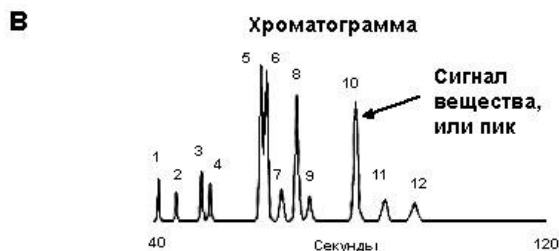
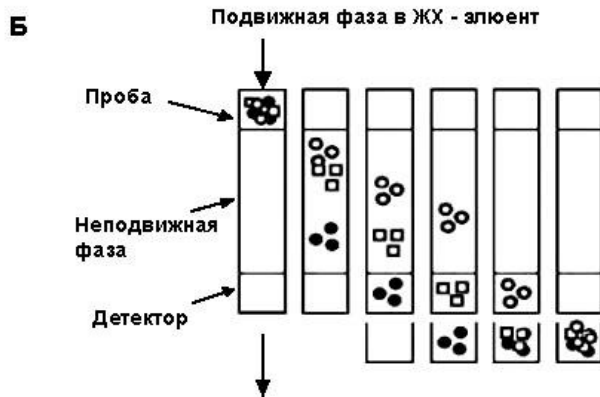
**(Б): 1 – окраска Кумасси голубым** (чувствительность  $\approx 50$  нг/пятно); 2 – окраска серебром, совместимая с масс-спектрометрией (чувствительность  $\approx 1$  нг/пятно); 3 – флуоресцентная метка Су3/Су5 (чувствительность  $\approx 0,5$  нг/пятно).



# и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ, англ. HPLC, High performance liquid chromatography).



Жидкостная элюентная хроматография. А – блок-схема основных узлов жидкостного хроматографа; Б – принцип разделения молекул смеси в жидкостном хроматографе; В – пример хроматограммы.

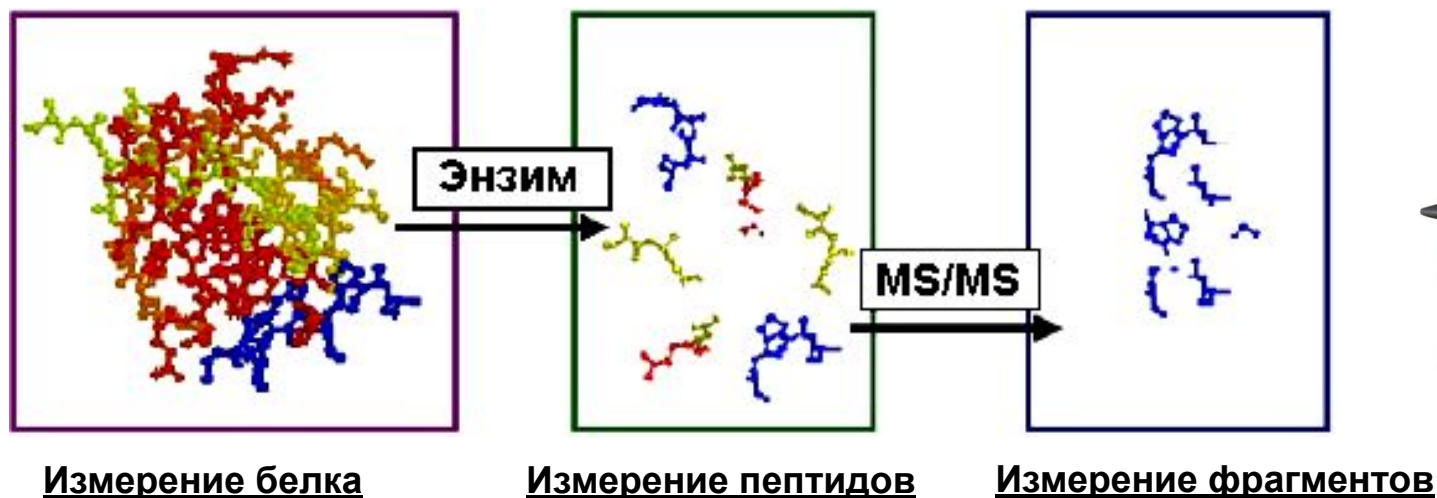


Блок-схема современного автоматизированного жидкостного хроматографа

### 3. Определение первичной структуры и идентификация белков

#### а) Протеомика, основанная на масс-спектрометрии (*MS-based proteomics*):

**Масс-спектрометрия (масс-спектральный анализ)** – это физический метод анализа вещества путем измерения **отношения массы к заряду ( $m/z$ ) ионов**, получаемых при ионизации исследуемого вещества, и определения относительного количества ионов со специфическим значением этого отношения.



Диапазон измеряемых масс принято указывать в атомных единицах массы [1 а.е.м. = 1 Д (дальтон) =  $1,660538921(73) \times 10^{-27}$  кг]

#### б) Первичную последовательность белков можно определять, пользуясь результатами геномики и биоинформатики.

# Масс-спектрометрия, МС (англ. MS)

Типичная процедура масс-спектрометрии включает три процесса:

- ◆ ионизацию молекул,
- ◆ разделение ионов по массам и
- ◆ детектирование ионов.



*Принципиальная схема масс-спектрометра – вакуумного прибора, использующего физические законы движения заряженных частиц в магнитных и электрических полях.*

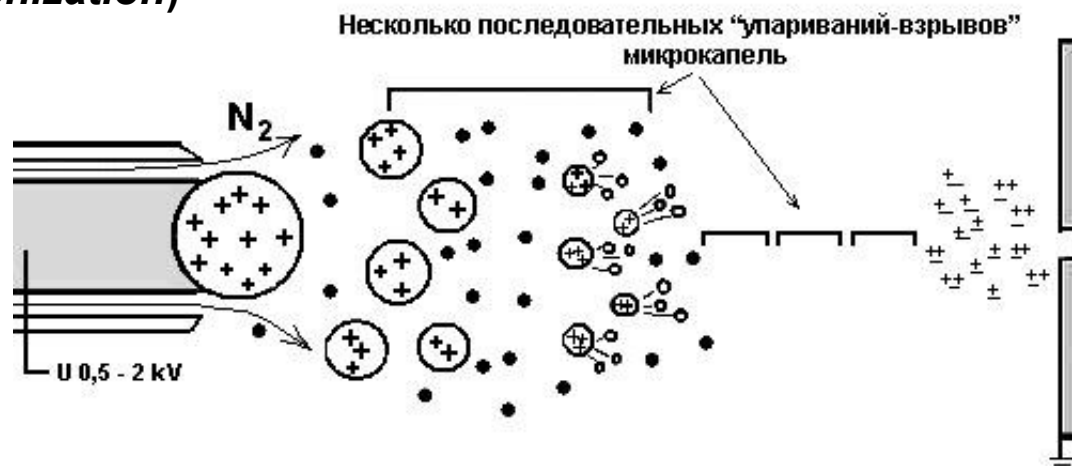
## Методы ионизации

1. MALDI
2. ESI

### ❖ Матричная лазерная десорбция/ионизация (англ. **MALDI**, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*)



### ❖ Электрораспылительная ионизация, или «электроспрей» (англ. **ESI**, *electrospray ionization*)



## Типы ионов

**Положительные:** - захват протона либо другого катиона (Na, K);  
- потеря электрона (катион-радикал).

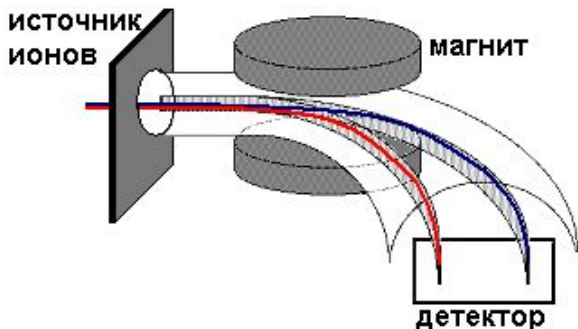
**Отрицательные:** - утрата протона;  
- захват электрона.



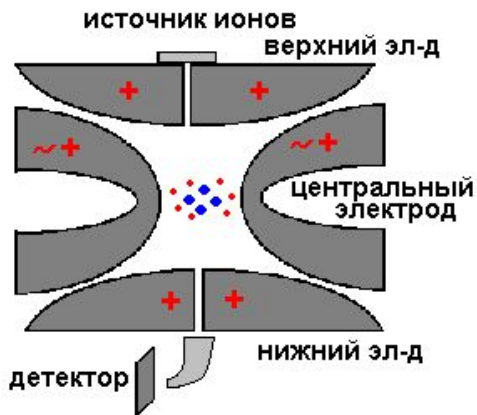
# Типы масс-анализаторов

Молекулярная масса ионов определяется по их поведению в электрических и/или магнитных полях.

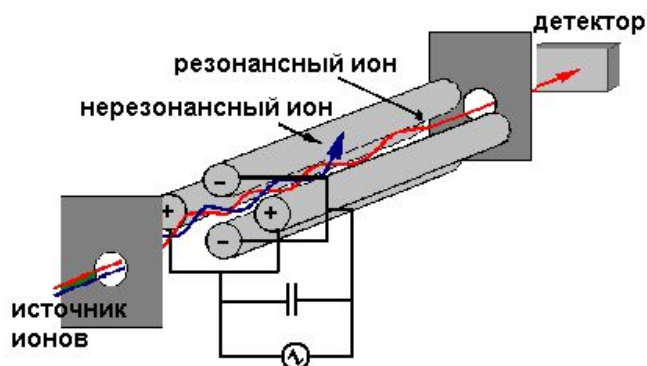
## Магнитный анализатор



## Ионная ловушка



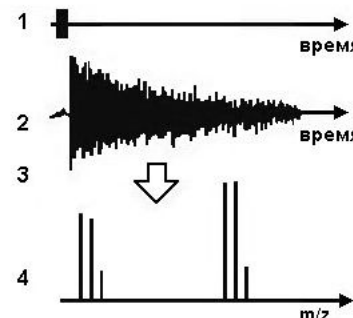
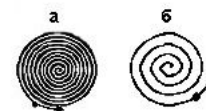
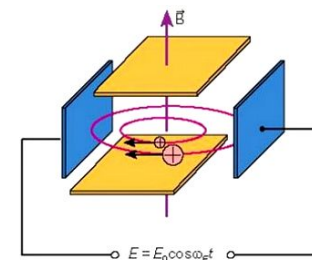
## Квадрупольный анализатор



## Времяпролетный масс-анализатор

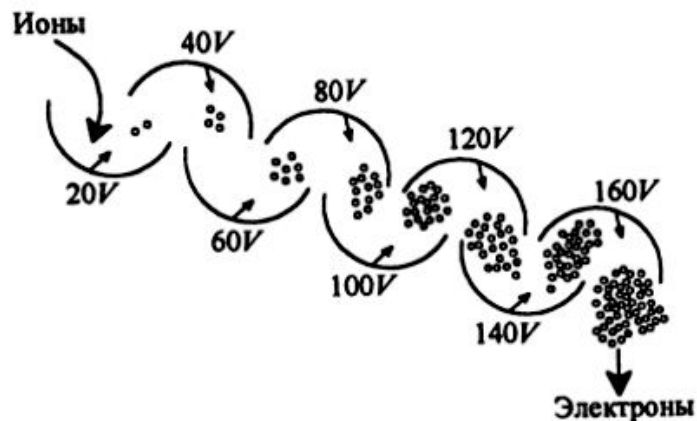
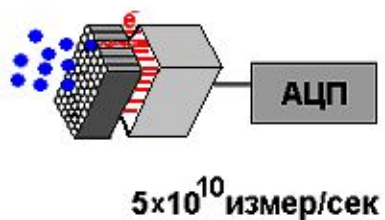


1. Времяпролетные (TOF)
2. Квадрупольные (Q)
3. Ионные ловушки (IT)
4. Ионно-циклотронного резонанса (ICR-FT)



Анализатор ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием (ИЦР ПФ, англ. FTICR MS, *Fourier-transform ion cyclotron resonance mass-analyzer*)

## Типы детекторов



Многоканальные  
пластины (MCP)  
Динады  
Магнит (ICR-FT)

Схема действия электронного умножителя (ЭУ)

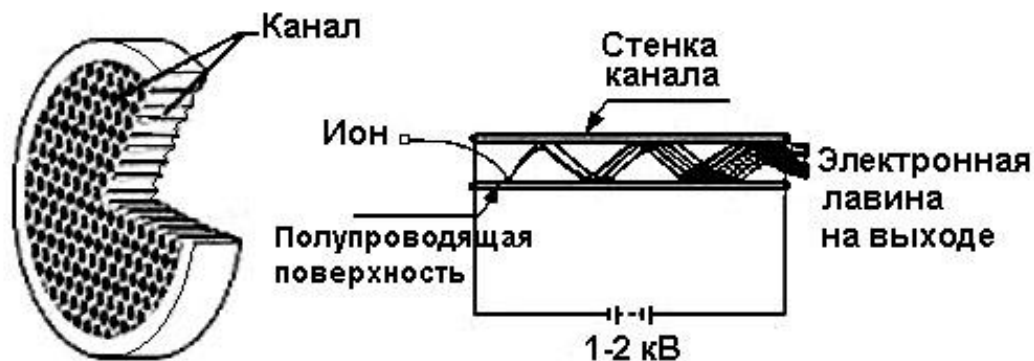
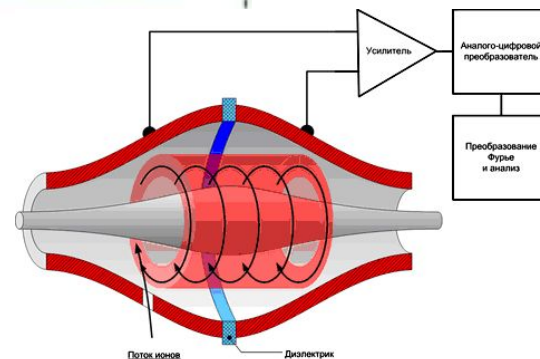
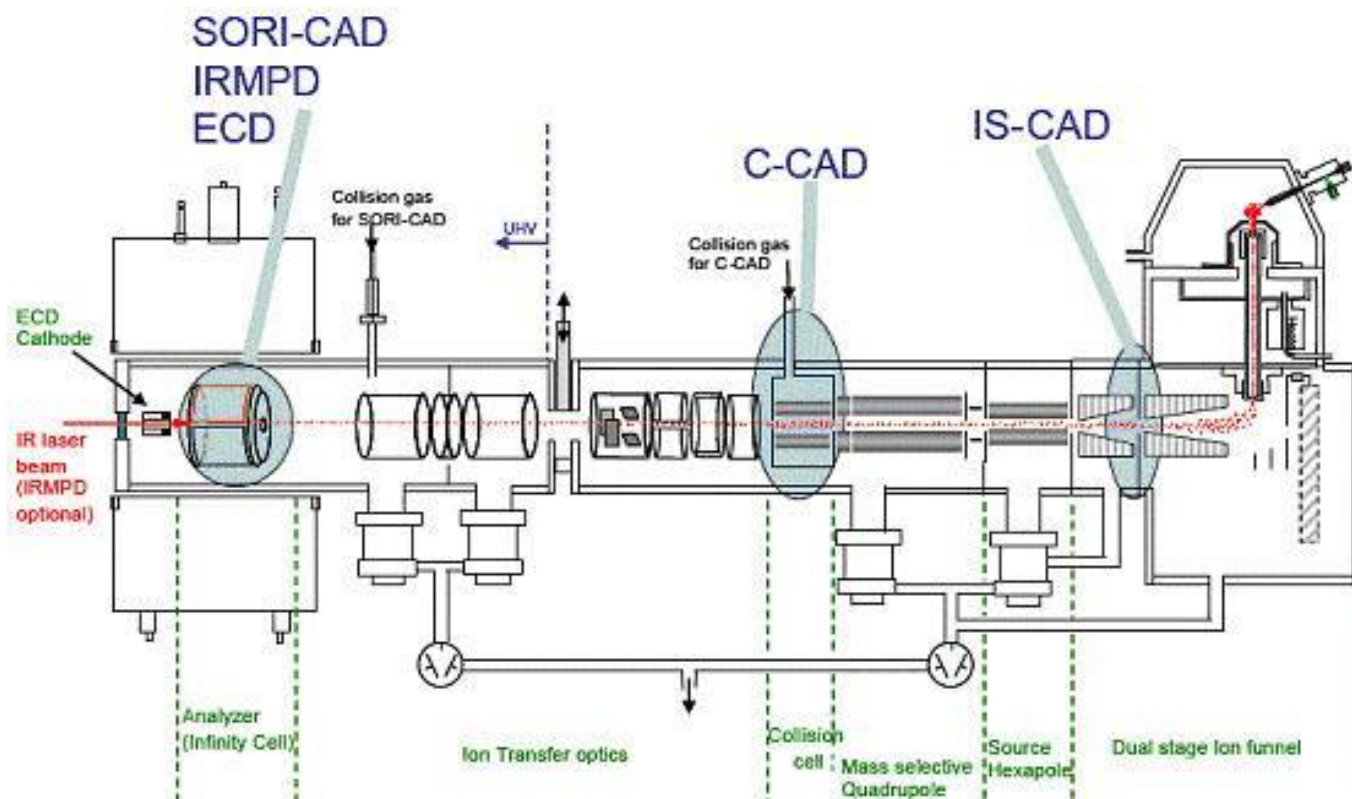


Схема многоканальной пластины (МКП, англ. MCP)

# Применяемые технологии масс-спектрометрии

- **MALDI-TOF** (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization -Time-Of-Flight*) - матричная лазерная десорбция/ионизация → времяпролетный масс-анализатор;
- **ESI-MS/MS** (*Electro Spray Ionization – tandem MS*) - электрораспылительная ионизация или электроспрей → tandemная масс-спектрометрия;
- **2DLC-ESI-MS/MS** - двумерная микроколоночная ВЭЖХ → ионизация в электроспрее → tandemная масс-спектрометрия.

# Гибридный масс-анализатор Orbitrap 3



<https://www.youtube.com/watch?v=RsFsaCkVqxM>

Орбитальная ионная ловушка

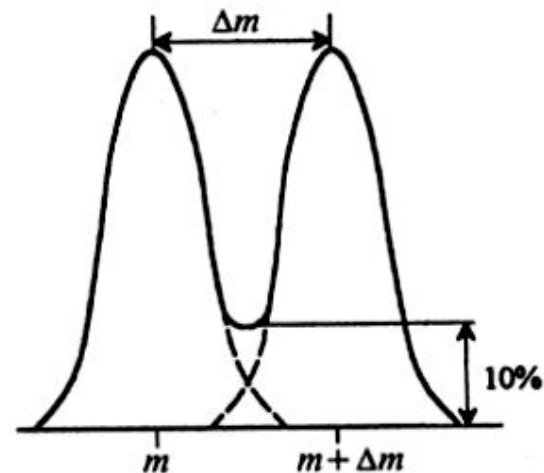
## Важные параметры масс-спектрометров

Чувствительность – какой величины ионы могут быть обнаружены;

Разрешение – как хорошо различные массы могут быть определены;

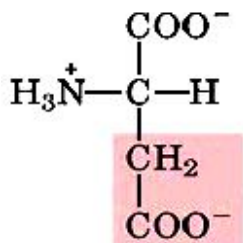
Точность – насколько воспроизводимы и точны измеряемые массы.

**Разрешение масс-спектрометра (R)** – это возможность получать на данном приборе отдельный сигнал от двух ионов с массами  $m$  и  $(m+\Delta m)$

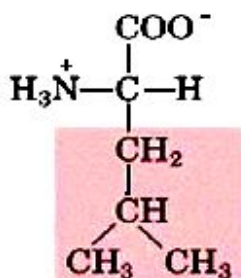


В зависимости от глубины ложбины между двумя соседними пиками принято говорить о разрешении на уровне 10% от высоты пиков для магнитных приборов и 50% - для квадрупольных.

# Принцип масс-спектрометрии



Аспаргат



Лейцин

$$[\text{MH}]^+ = \sum \text{a.o.} + 18 (\text{H, OH}) + 1 (\text{H}^+) \\ \text{МОНОИЗОТОПН.}$$

## Моноизотопные массы аминокислотных остатков

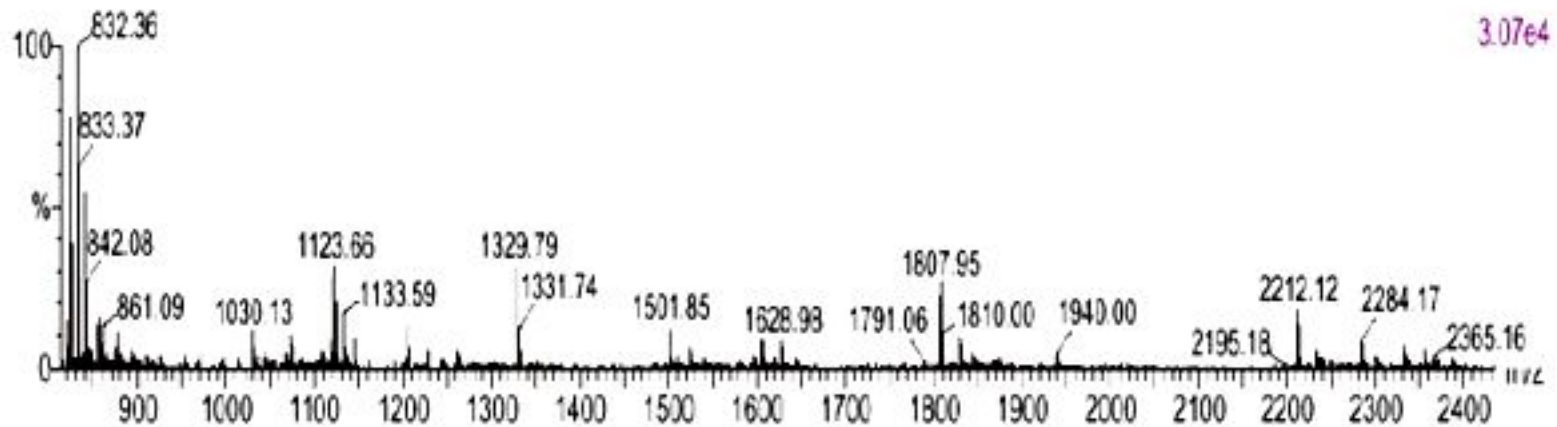


## Ферменты для протеомного анализа

Трипсин	К-X и R-X, за исключением, когда X=P
Эндопротеаза Lys-C	К-X, за исключением, когда X=P
Эндопротеаза Arg-C	R-X, за исключением, когда X=P
Эндопротеаза Asp-N	X-D
Эндопротеаза Glu-C	E-X, за исключением, когда X=P
Химотрипсин	X-L, X-F, X-Y и X-W
Цианоген бромид	X-M

Alanine	Ala	A	C3H5N1O1	71.0788
Cysteine (SH)	Cys	C	C3H5N1O1S1	103.1448
Asp. acid	Asp	D	C4H5N1O3	115.0886
Glu. acid	Glu	E	C5H7N1O3	129.1155
Phenylala.	Phe	F	C9H9N1O1	147.1766
Glycine	Gly	G	C2H3N1O1	57.0519
Histidine	His	H	C6H7N3O1	137.1411
Isoleu.	Ile	I	C6H11N1O1	113.1594
Lysine	Lys	K	C6H12N2O1	128.1741
Leucine	Leu	L	C6H11N1O1	113.1594
Methionine	Met	M	C5H9N1O1S1	131.1986
Asparagine	Asn	N	C4H6N2O2	114.1038
Proline	Pro	P	C5H7N1O1	97.1167
Glutamine	Gln	Q	C5H8N2O2	128.1307
Arginine	Arg	R	C6H12N4O1	156.1875
Serine	Ser	S	C3H5N1O2	87.0782
Threonine	Thr	T	C4H7N1O2	101.1051
Valine	Val	V	C5H9N1O1	99.1326
Tryptopha.	Trp	W	C11H10N2O1	186.2132
Tyrosine	Tyr	Y	C9H9N1O2	163.1760

# Типичные данные MALDI-TOF



M/Z	1073.9447	1523.8627
825.1050	1117.6061	1605.9631
832.3558	1123.6556	1628.0182
841.0837	1133.5912	1806.9623
854.3448	1145.6552	1828.9904
855.1065	1205.6876	2211.1045
857.0616	1227.6707	2233.0842
877.0778	1329.7854	2283.1978
1030.1257	1501.8513	2332.2441

26 kDa protein

pI = 9

# Тандемная масс-спектрометрия

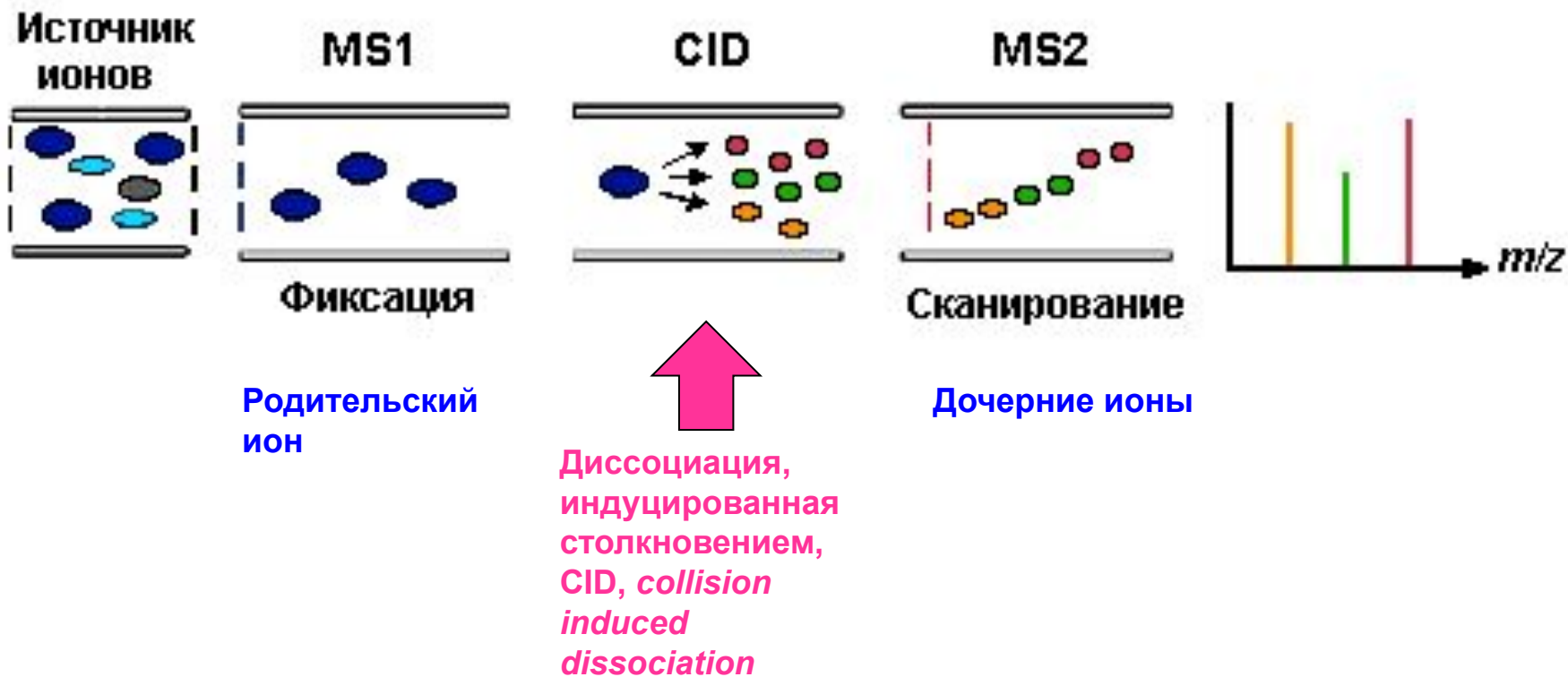
**МС**

М.в. родительского  
(молекулярного) иона

**МС/МС**

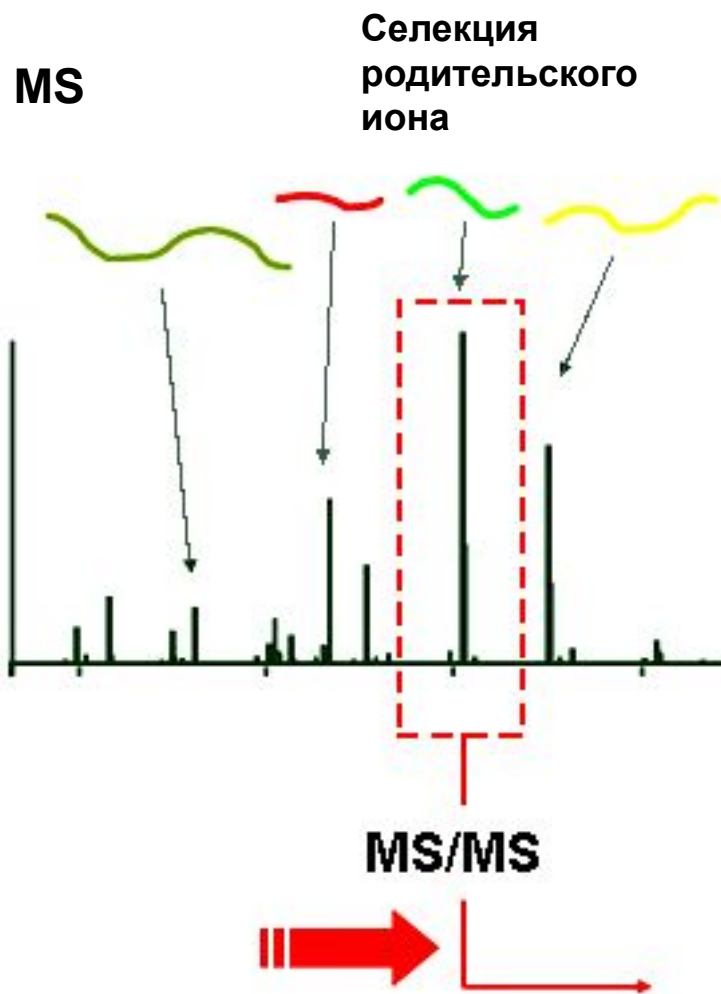
Первая МС: «селекция»  
родительского иона

Вторая МС: детекция дочернего  
иона

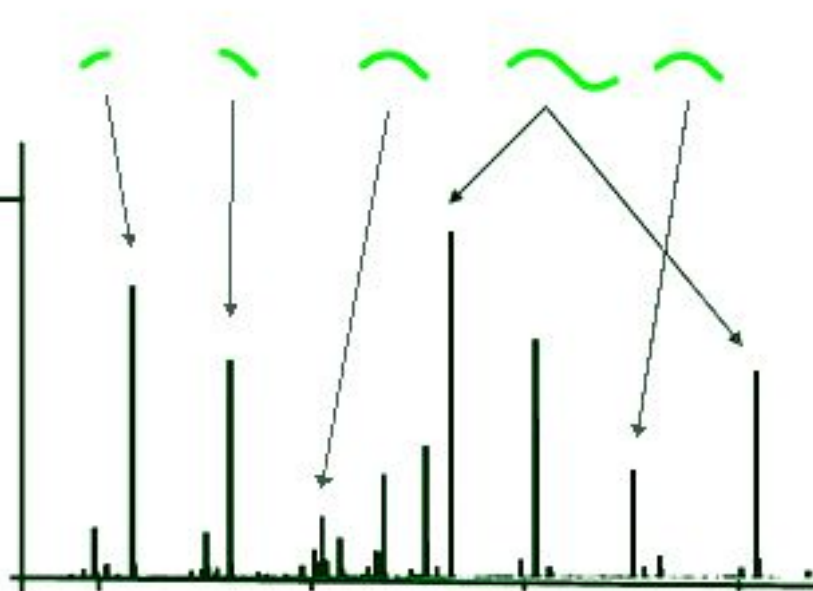




# Тандемная масс-спектрометрия



Предшествующая селекция +  
диссоциация, индуцированная  
столкновением (англ. *CID*, *collision  
induced dissociation*)



Дочерние ионы

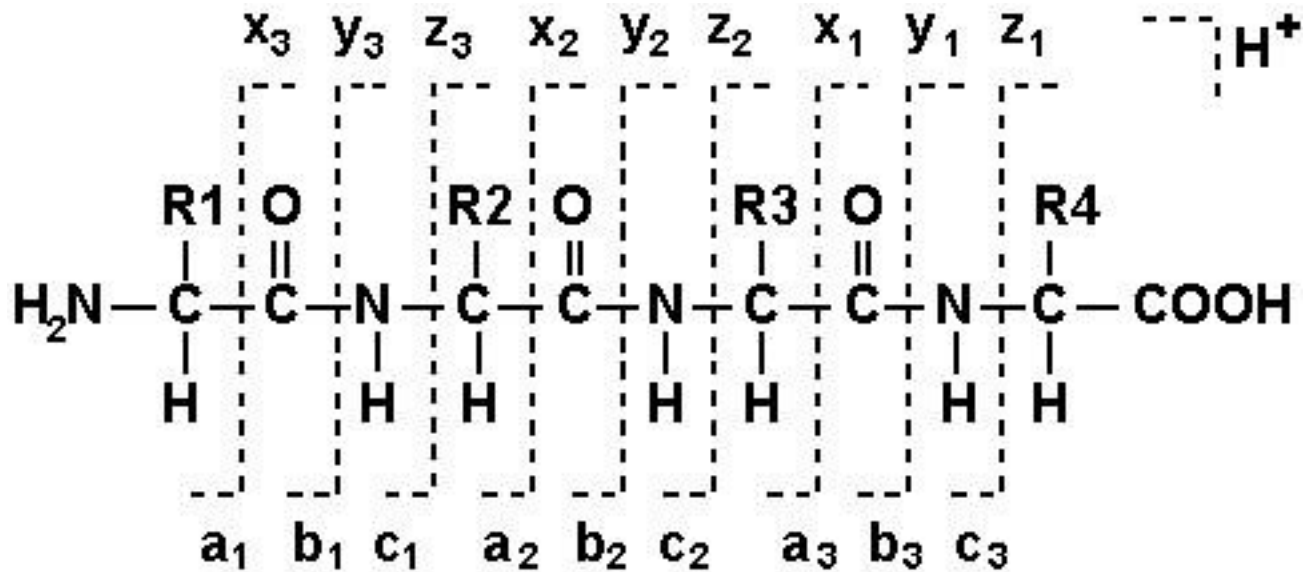
# Фрагментация пептида

Диссоциация, индуцированная столкновениями *CID*

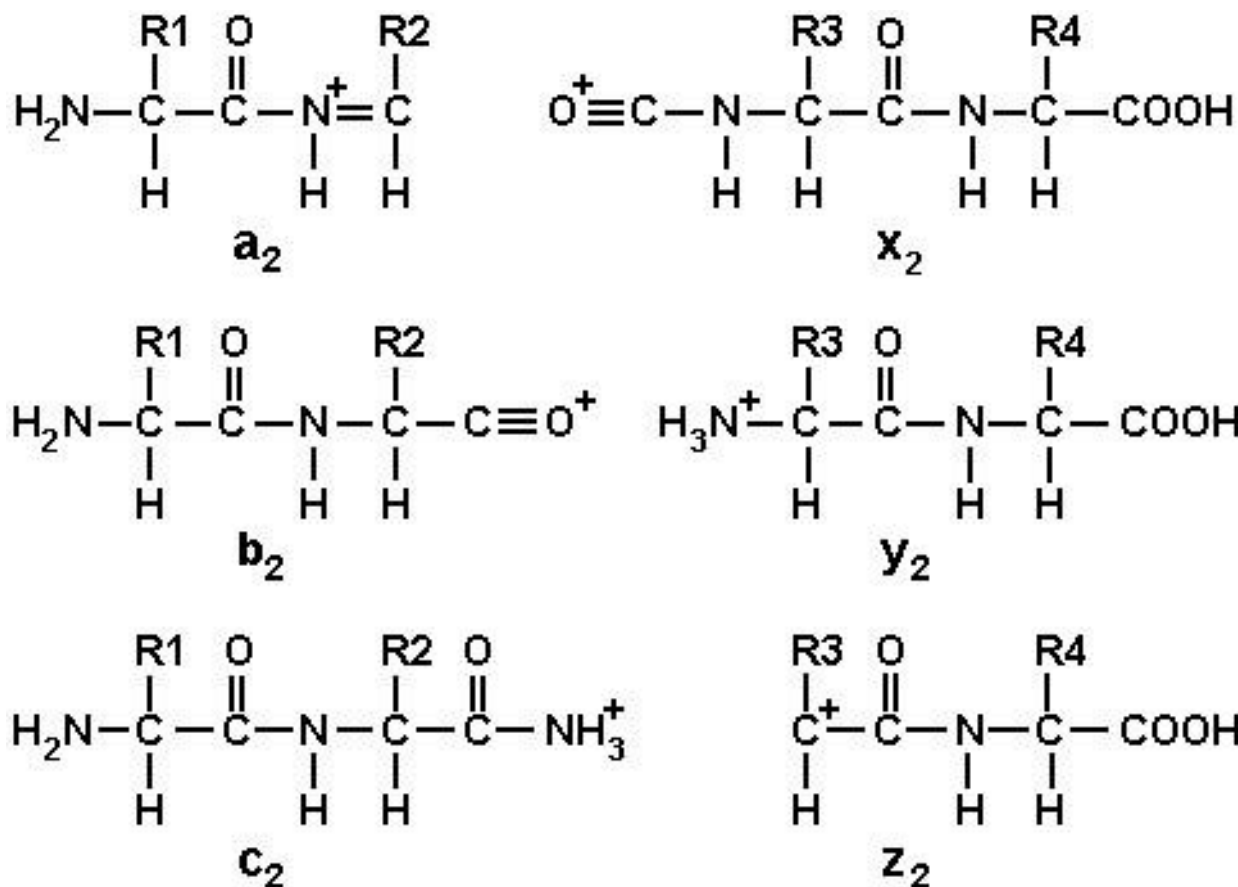


Существуют определенные правила, устанавливающие направления фрагментации химических соединений в масс-спектрометре

- ❑ Фрагменты могут быть обнаружены, только если они несут, по крайней мере, один заряд
- ❑ Если этот заряд остается на N-конце фрагмента, то ион классифицируется либо как *a*, *b* или *c*
- ❑ Если заряд остается на C-конце, то тип иона будет либо *x*, *y* или *z*



В зависимости от того, какая связь разрушается и в какой части фрагмента сохраняется заряд, выделяют несколько групп ионов:



При разрыве связи **C-C** образуются ионы **a** и **x**, при разрыве связи **C-N** — ионы **b** и **y**, при разрыве связи **N-C** — ионы **c** и **z**. Фрагменты **a**, **b**, **c** содержат N-концевую аминокислоту исходного пептида, а фрагменты **x**, **y**, **z** — C-концевую аминокислоту исходного пептида.

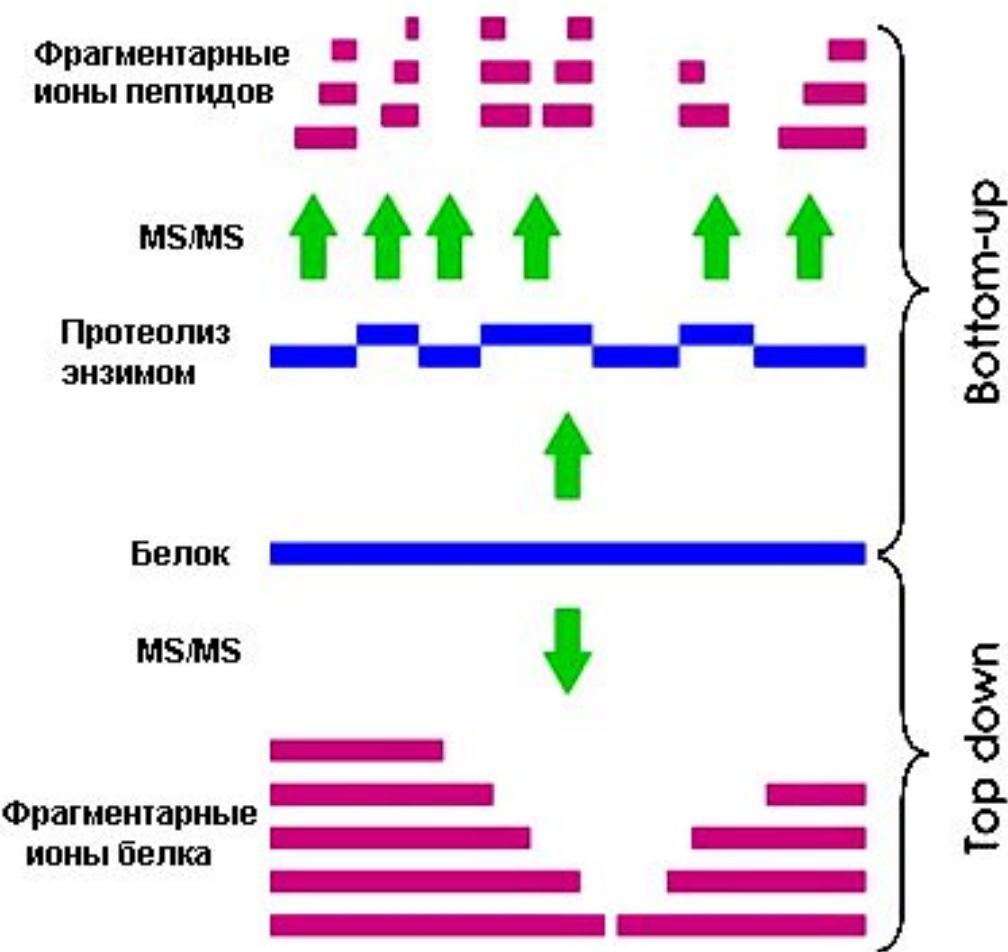
# Фрагментация пептида

Пример:

Пептид : S-G-F-L-E-E-D-E-L-K

MW	ион			ион	MW
88	b <sub>1</sub>	S	GFLEEDELK	y <sub>9</sub>	1080
145	b <sub>2</sub>	SG	FLEEDELK	y <sub>8</sub>	1022
292	b <sub>3</sub>	SGF	LEEDELK	y <sub>7</sub>	875
405	b <sub>4</sub>	SGFL	EEDELK	y <sub>6</sub>	762
534	b <sub>5</sub>	SGFLE	EDELK	y <sub>5</sub>	633
663	b <sub>6</sub>	SGFLEE	DELK	y <sub>4</sub>	504
778	b <sub>7</sub>	SGFLEED	ELK	y <sub>3</sub>	389
907	b <sub>8</sub>	SGFLEEDE	LK	y <sub>2</sub>	260
1020	b <sub>9</sub>	SGFLEEDEL	K	y <sub>1</sub>	147

# Стратегии масс-спектрометрической характеристики белков протеома:

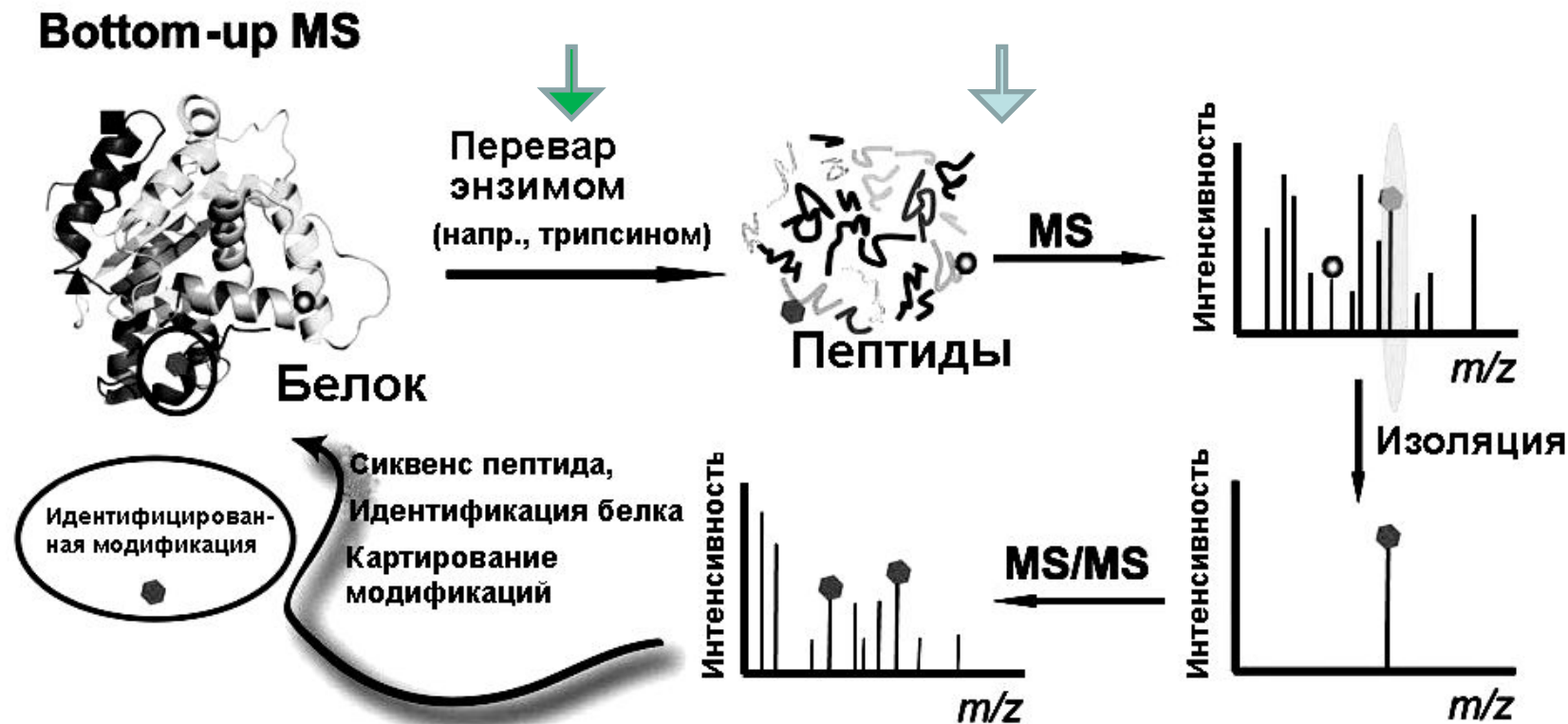


В **bottom-up** (снизу-вверх) протеомике неизвестный белок специфически расщепляется химически или ферментативно на пептиды, массы которых определяются с помощью масс-спектрометрии.

В **top-down** (сверху-вниз) протеомике с помощью масс-спектрометрии анализируются целые белки

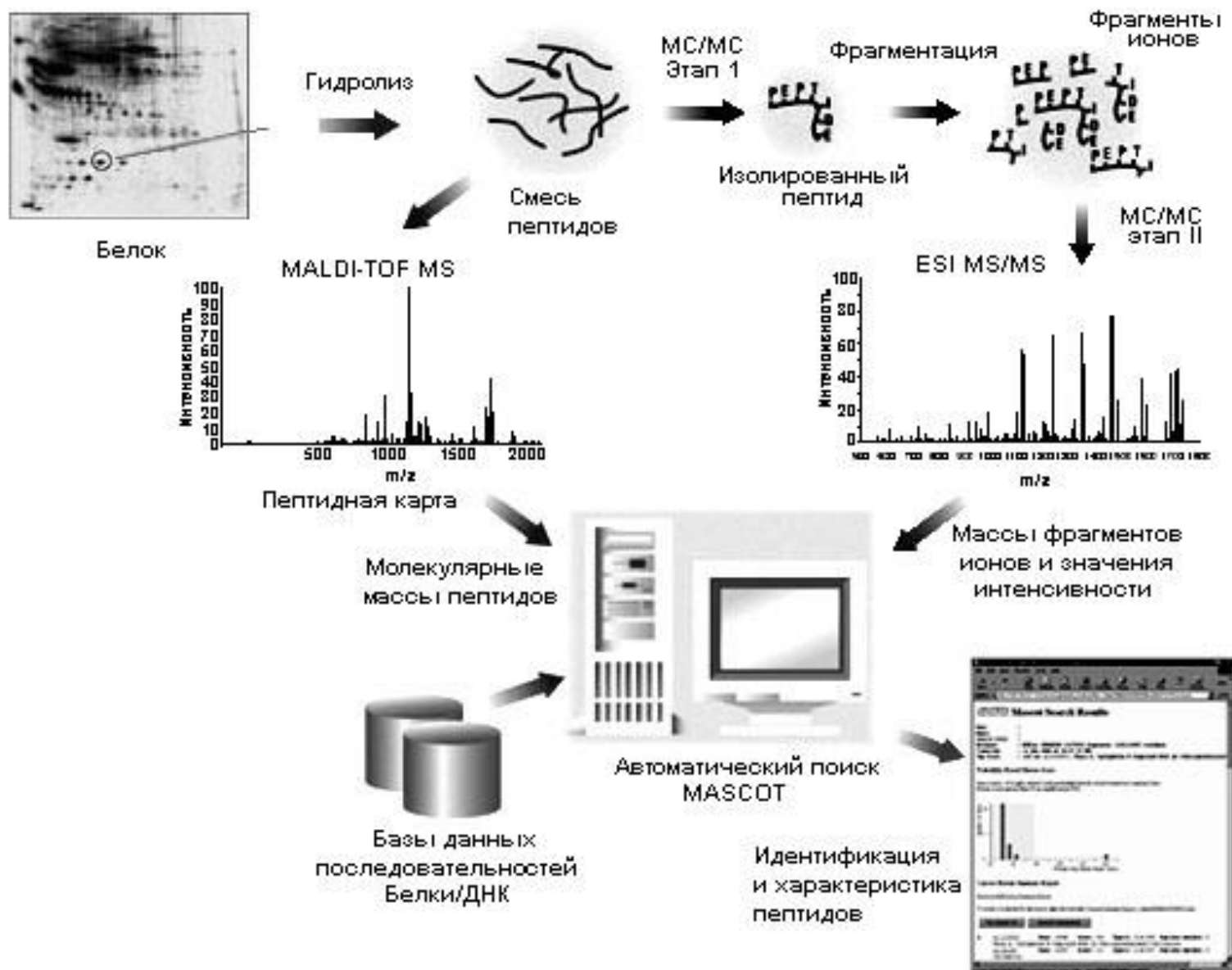
# Протеомика «снизу-вверх», или (shot-gan)

фингерпринтинг масс пептидов (англ. *PMF, Peptide Mass Fingerprint* – дактилоскопия масс пептидов, или отпечатки пальцев-масс-пептидов)



- определение набора значений масс пептидов, формируемых после проведения высокоспецифического гидролиза исследуемого белка, или получение *масс-спектрометрической пептидной карты*.

# Схема этапов MALDI-TOF масс-спектрометрии

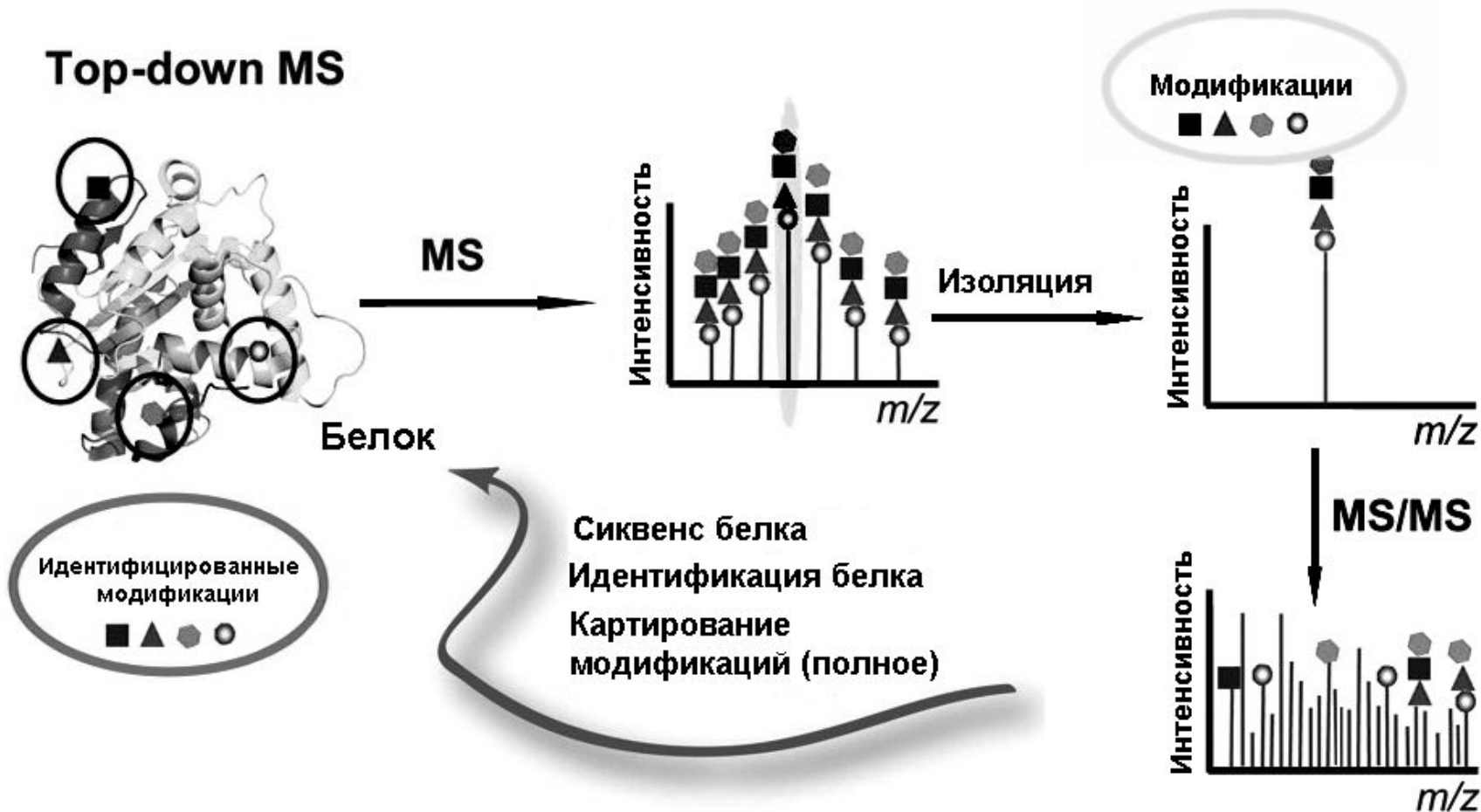




# Протеомика «сверху-вниз»

масс-анализ целых белков без протеолиза

## Top-down MS



# Компьютерный поиск сходства полученных спектров со спектрами в базах данных

## MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name  Email

Search title

Database

Taxonomy

Enzyme  Allow up to  missed cleavages

Fixed modifications: AB\_oligo\_ICATd0 (C), AB\_oligo\_ICATd8 (C), Acetyl (K), Acetyl (N-term), Amide (C-term)

Variable modifications: AB\_oligo\_ICATd0 (C), AB\_oligo\_ICATd8 (C), Acetyl (K), Acetyl (N-term), Amide (C-term)

Protein mass  kDa Peptide tol.  Da

Mass values  MH<sup>+</sup>  M<sub>r</sub> Monoisotopic  Average

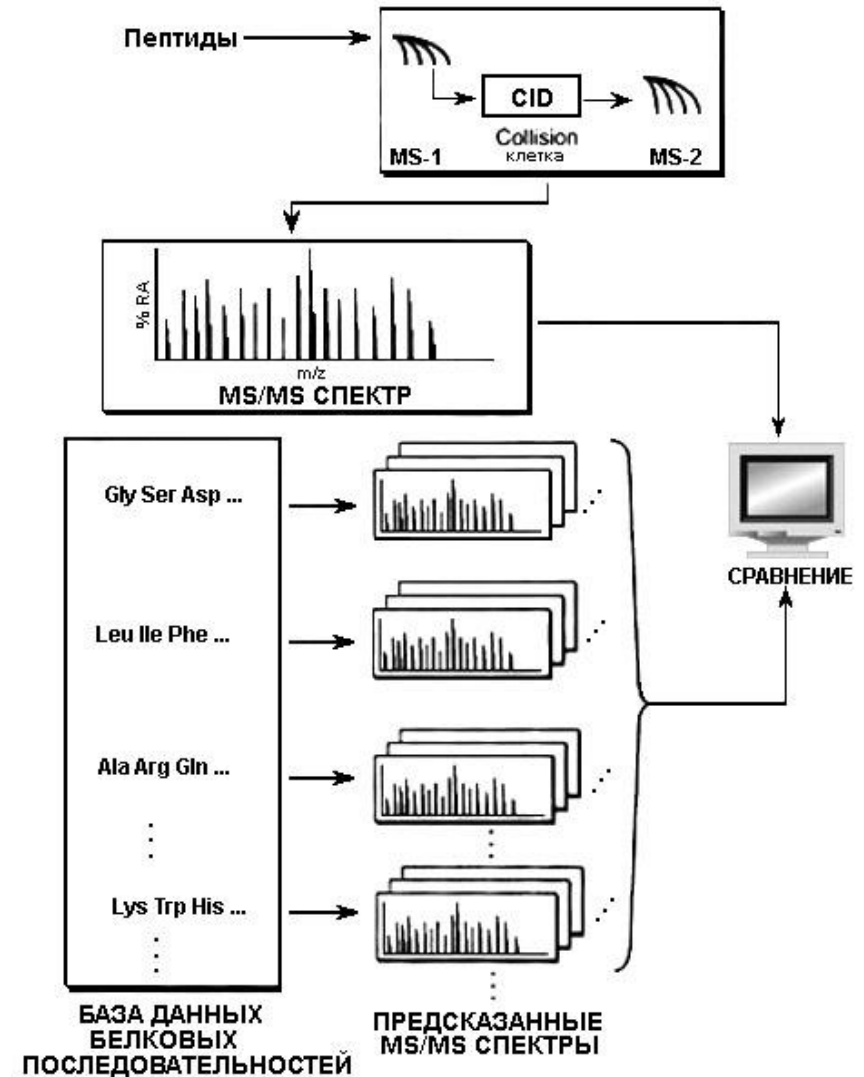
Data file  Browse...

Query

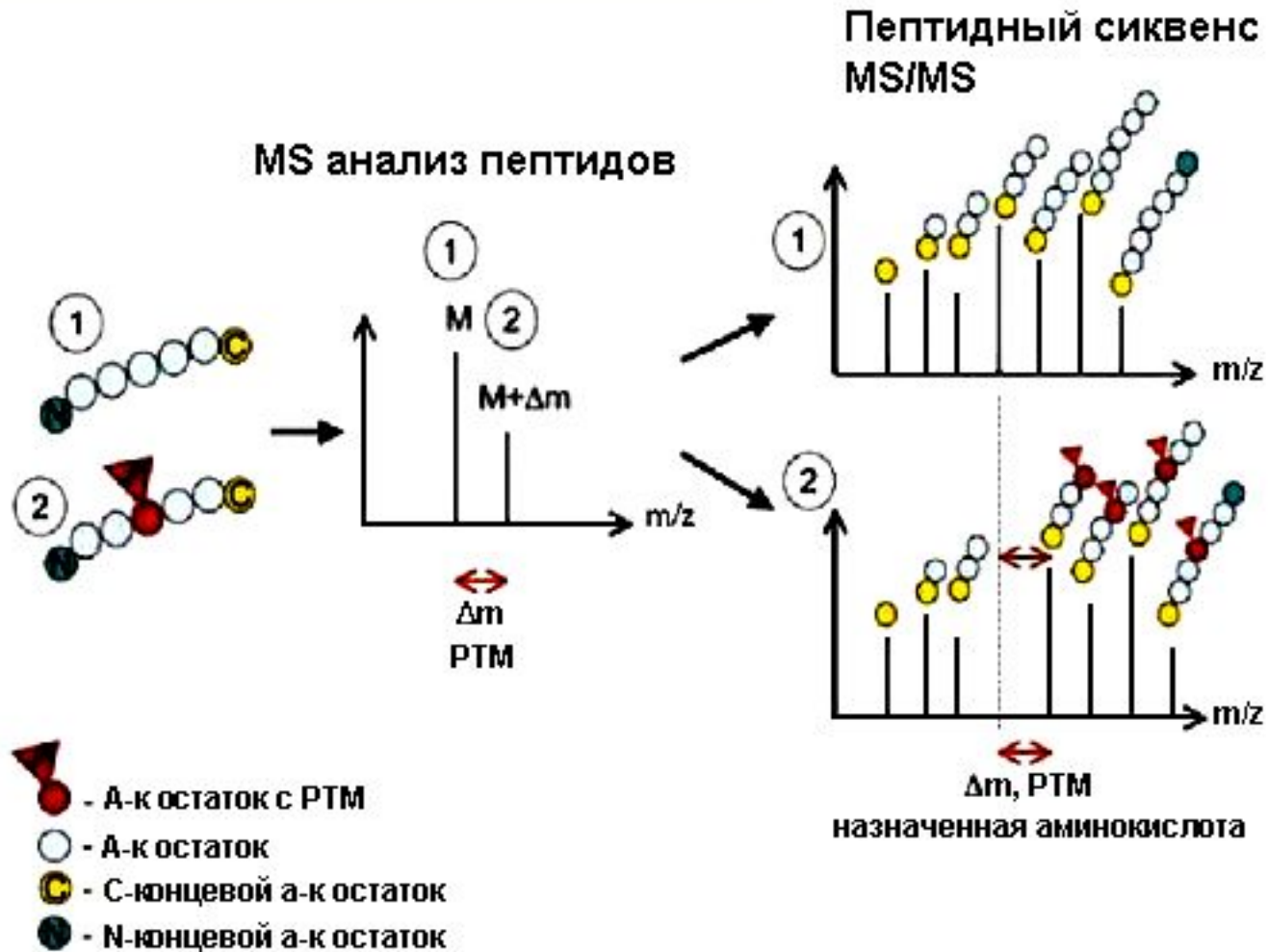
Overview  Report top  hits

## PMF on WEB

- Mascot
  - [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)
- ProFound
  - [http://129.85.19.192/profound\\_bin/WebProFound.exe](http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)
- MOWSE
  - <http://srs.hgmp.mrc.ac.uk/cgi-bin/mowse>
- PeptideSearch
  - <http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/Homepage.html>
- PeptIdent
  - <http://us.expasy.org/tools/peptident.html>




# Тандемная масс-спектрометрия (MS/MS) для картирования посттрансляционных модификаций (PTM)



# СРЕДСТВА ИДЕНТИФИКАЦИИ РТМ

## Предсказание посттрансляционных модификаций

- **ChloroP** - Prediction of chloroplast transit peptides
- **LipoP** - Prediction of lipoproteins and signal peptides in Gram negative bacteria
- **MITOPROT** - Prediction of mitochondrial targeting sequences
- **PATS** - Prediction of apicoplast targeted sequences
- **PlasMit** - Prediction of mitochondrial transit peptides in Plasmodium falciparum
- **Predotar** - Prediction of mitochondrial and plastid targeting sequences
- **PTS1** - Prediction of peroxisomal targeting signal 1 containing proteins
- **SignalP** - Prediction of signal peptide cleavage sites
  
- **DictyOGlyc** - Prediction of GlcNAc O-glycosylation sites in Dictyostelium
- **NetCGlyc** - C-mannosylation sites in mammalian proteins
- **NetOGlyc** - Prediction of O-GalNAc (mucin type) glycosylation sites in mammalian proteins
- **NetGlycate** - Glycation of epsilon amino groups of lysines in mammalian proteins
- **NetNGlyc** - Prediction of N-glycosylation sites in human proteins
- **OGPET** - Prediction of O-GalNAc (mucin-type) glycosylation sites in eukaryotic (non-protozoan) proteins
- **YinOYang** - O-beta-GlcNAc attachment sites in eukaryotic protein sequences
  
- **big-PI Predictor** - GPI Modification Site Prediction
- **GPI-SOM** - Identification of GPI-anchor signals by a Kohonen Self Organizing Map
- **Myristoylator**  - Prediction of N-terminal myristoylation by neural networks
- **NMT** - Prediction of N-terminal N-myristoylation
- **CSS-Palm** - Palmitoylation site prediction with CSS
- **PrePS** - Prenylation Prediction Suite

# СПИСОК МОДИФИКАЦИЙ И ИХ СВОЙСТВА

<b>Modification</b>	<b>Position</b>	<b>Monoisotopic mass</b>	<b>Average mass</b>
Acetylation	Lysine, N-terminus	42.010	42.0370
Biotinylation	Lysine, N-terminus	226.0776	226.2930
Carbamidomethyl	Cysteine	57.0340	57.0720
Carboxymethyl	Cysteine	58.0055	58.0370
Carbonyl	N-terminal	43.0058	43.0250
Homoarginine	Lysine	42.0218	42.0404
Methyl ester	Aspartate, Glutamate, C-terminus	14.0157	14.0270
Oxidation	M, H, W	15.9950	15.9990
Phosphorylation	Serine, Threonine, Tyrosine	79.9663	79.9799
Propionamide	Cysteine	71.0371	71.0790
PTC	Lysine, N-terminus	135.0143	135.1894
5-pyridylethyl	Cysteine	105.0579	105.1390
Sodiated	Aspartate, Glutamate, C-terminus	21.9819	21.9820
Sulphone	Methionine	31.9898	31.9990

## Пространственная структура белков

«Аминокислотная последовательность белка однозначно определяет его пространственную структуру»

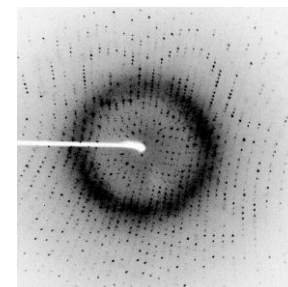
### Экспериментальный подход:

- Рентгеноструктурный анализ кристаллов белка (рентгеновская кристаллография):

анализируется рассеянное атомами кристалла рентгеновское излучение, благодаря чему удаётся воссоздать распределение электронной плотности в кристалле.

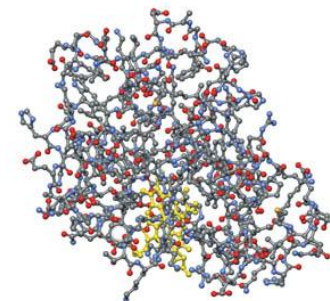
- Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

– основана на поглощении радиочастотного электромагнитного излучения ядрами образца с ненулевым магнитным моментом, помещенного в постоянное магнитное поле.



### Биоинформатический подход:

- Предсказание пространственной структуры белка на основе информации об его аминокислотной последовательности  
(иногда получается, но надо сравнивать с экспериментально полученной)



Modeller - компьютерная программа, которая моделирует трехмерные структуры белков и строит их со всеми необходимыми пространственными ограничениями.

# Функциональная протеомика

**Цель функциональной протеомики:** определение функциональных свойств протеома.

**Задачи функциональной протеомики:**

- установление функций каждого из белков протеома;
- предсказание функциональной роли отдельных белков путем сопоставления их качественного и количественного состава в клетке на разных стадиях и в разных состояниях ее развития;
- анализ межбелковых взаимодействий;
- выяснение взаимосвязи между структурой и функцией белков;
- изучение механизмов функционирования белков.

**Подходы изучения:**

- **Экспериментальный-** анализ микрочипов, РНК-интерференция и двугибридный анализ и др
- **Биоинформатический –** предсказание функции на основе вычислительных методов.

Функция белка — очень широкий термин: роли белков варьируют от катализа биохимических реакций до передачи сигнала и клеточного транспорта, и один белок может играть определённую роль в нескольких клеточных процессах.

## Функция может ссылаться на роль белка в клетке:

**Энзимные** (ферментные) белки, которые служат катализаторами биохимических реакций в клетках и таких функций как пищеварение;

**Транспортные** белки, такие как гемоглобин, который переносит кислород из лёгких к другим частям тела;

**Структурные** белки, такие как коллаген и эластин, которые обеспечивают фиброзную основу соединительных тканей в животных организма;

**Резервные** (запасные) белки, такие как казеин, который является главным источником аминокислот для организмов детёнышей млекопитающих;

**Гормональные** белки, такие как инсулин, который помогает регулировать концентрацию сахара в крови;

**Рецепторные** белки, которые встраиваются в мембраны нервных клеток и детектируют химические сигналы, передаваемые другими нервными клетками;

**Сократимые** белки, такие как миозин, который играет большую роль в движении мышц;

**Защитные** белки, включающие антитела, которые защищают организм от болезней.



## Например:

pRb - белок ретинобластомы (англ. *retinoblastoma protein*) – белок супрессора опухоли, дисфункционального при некоторых тяжелых формах рака.

Одной из функций pRb является предотвращение прогрессии чрезмерного роста клеток путём ингибирования клеточного цикла, пока клетки не готовы к делению. Когда клетка готова к делению, pRb фосфорилируется, становится неактивным и позволяет проходить клеточному циклу. Связывание и инактивация pRb может привести к раку.

Ортологи Rb1 были также определены у большинства млекопитающих, для которых доступны полные данные генома.

Rb принадлежит семейству «карманных» белков (англ. *pocket protein family*), члены которого имеют карман для функционального связывания с другими белками. Он рекрутирует несколько ферментов ремоделирования хроматина, таких как метилазы и ацетилазы.

# Некоторые биоинформатические методы предсказания функции

## 1. Методы, основанные на гомологии

Белки, сходные по последовательности, могут иметь также и сходную функцию. Однако не всегда близкородственные белки выполняют одну и ту же функцию. Многие белки с одинаковой функцией имеют едва обнаруживаемые сходства, тогда как встречаются белки, очень схожие по последовательности, но совершенно разные по функциям.

## 2. Методы, основанные на мотивах последовательностей

Находят в искомой последовательности уже известные домены (или супрадомены, т.е. комбинации из двух или более последовательно расположенных доменов) для предположения возможных функций. Мотивы (более короткие характерные последовательности, связанные с определенными функциями) также могут быть использованы для предсказания внутриклеточной локализации белка. Некоторые особенности функции белков можно предсказать без сравнения с полноразмерными гомологичными последовательностями.

## 3. Методы, основанные на структуре белка

Поскольку 3D-структура белка, как правило, является более консервативной, чем белковая последовательность, сходство структур может указывать на сходство и функций белков. Вместо структуры всего белка, поиск ведется по структурам отдельных мотивов, содержащим, например, сайт связывания лиганда или активный сайт фермента.

## 4. Методы, основанные на геномном контексте

Используют для установления молекулярных функций, предсказание на основе геномного контекста может быть использовано для предположения биологического процесса, в котором участвует белок. Например, белки, участвующие в одном и том же пути передачи сигнала, имеют общий для всех видов геномный контекст.

## Биоинформатически функцию белка pRb можно рассматривать с разных перспектив

### 1. Биохимическая функция (молекулярная функция)

RBP связывает ретинол, может быть транспортным

### 2. Функциональное назначение, основанное на гомологии

RBP = Другой транспортный белок

Тоже может быть транспортным

### 3. Функция, основанная на структуре

RBP формирует карман

### 4. Функция, основанная на специфичности связывания с лигандом

RBP связывает витамин А

### 5. Функция, основанная на клеточном процессе

RBP является обильным, растворимым, секретлируемым

### 6. Функция, основанная на биологическом процессе

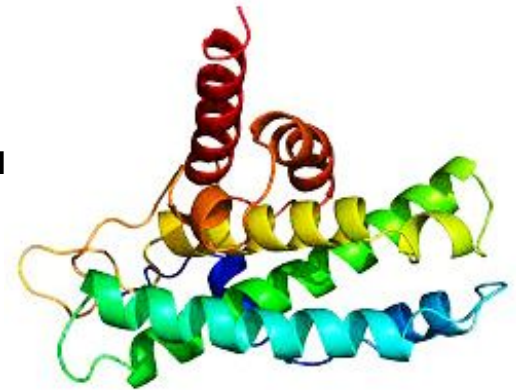
RBP является существенным для зрения

### 7. Функция, основанная на «протеомике» или высокопрои «Функциональной геномике»

Высокопроизводительные анализы показывают...

RBP уровни повышены при почечной недостаточности

RBP уровни уменьшены при болезни печени



## Первичные структуры структурно-гомологичного семейства эндотелинов / токсинов

Эндотелин 1 (свинья)	CSCSSSLMDKECVYFCHLDIIW
Эндотелин 2 (человек)	CSCSSWLDKECVWFCHLDIIW
Эндотелин 3 (крыса, человек)	CTCFTYKDKECVYYCHLDIIW
Сарафотоксин S6 a1 (змея)	CSCKDMTDKECLNFCHQDVIW
Сарафотоксин S6 a11 (змея)	CSCKDMSDKECLNFCHQDVIW
Сарафотоксин S6 c (змея)	CTCNDMTDEECLNFCHQDVIW
сарафотоксин S6 b (змея)	CSCKDMTDKECLYFCHQDVIW
Сарафотоксин S6-D (змея)	CTCKDMTDKECLYFCHQDIIW
Бибротоксин (змея)	CSCADMTDKECLYFCHQDVIW

**Первичные структуры природных пептидов брадикининов, полученных из разных живых организмов. Жирным шрифтом указаны квазиконсервативные области**

млекопитающие, амфибии

корова (*Bos taurus*)

корова (*Bos taurus*)

корова (*Bos taurus*)

лошадь (*Equus caballus*)

человек (*Homo sapiens*)

крыса (*Rattus norvegicus*)

крыса (*Rattus norvegicus*)

крыса (*Rattus norvegicus*)

крыса (*Rattus norvegicus*)

курица (*Gallus gallus*)

амфибии, рептилии

лягушки (род *Rana*)

японская лягушка (*Rana nigromaculata*)

южноамериканская лягушка (*Phyllomedusa rhodei*)

корейская лягушка (*Rana rugosa*)

корейская лягушка (*Rana rugosa*)

корейская лягушка (*Rana rugosa*)

азиатская лягушка (*Bombina orientalis*)

осы

осы

оса (*Polistes rothneyi*)

оса (*Polistes chinensis*)

оса (*Polistes jadvigae*)

оса (*Polistes jadvigae*)

оса (*Polistes jadvigae*)

оса (*Megascolia flavifrons*)

оса (*Vespa tropica*)

оса (*Vespa analis*)

оса (*Vespa mandarinia*)

японская оса (*Vespa xanthoptera*)

оса (*Vespula maculifrons*)

оса (*Vespula maculifrons*)

оса (*Paravespula lewisii*)

RPPGFSPPFR

MKRPPGFSPPFR

KRPPGFSPPFR

SLMKRPPGFSPPFR

LKRPPGFSPPFR

SLMKRPPGFSPPFRSSI

MISRPPGFSPPFR

ISRPPGFSPPFR

MISRPPGFSPPFRL

ISRPPGFSPPFRL

RPPGFTPLR

RPPGFTPFR

RPPGFSPPFRVAPAS

VPPGFTPFR

RPPGFSPPFRIV

RPPGFTPFRIAPEIV

RPPGFTPFRIAPEI

RPPGFTPFRIAPE

RPPGFSPPFRGKHF

GRPPGFSPPFR

ARPPGFSPPFR

ARPPGFTPFR

SKRPPGFSPPFR

RTRPPGFSPPFR

RKRPPGFTPFR

RRRPPGFSPPFR

RPPGFTPFRKA

GRPPGFSPPFRVV

GRPPGFSPPFRVI

GRPPGFSPPFRID

ARPPGFSPPFRIV

TATRRRGRRPPGFSPPFR

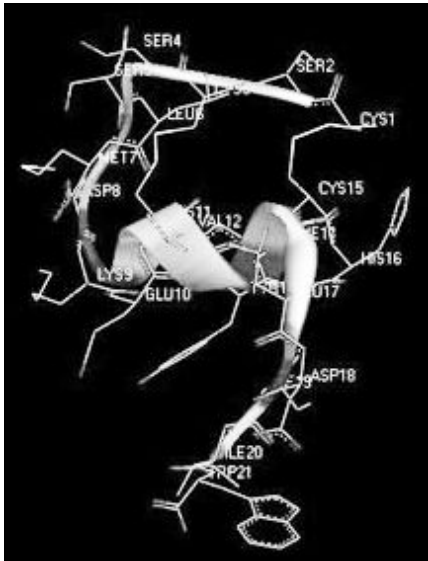
TTRRRGRPPGFSPPFR

TATTKRRGRPPGFSPPFR

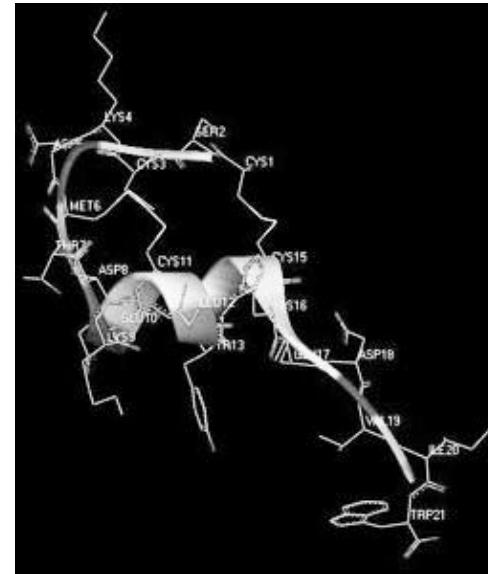
Эндотелин 1 (свинья)  
 Эндотелин 2 (человек)  
 Эндотелин 3 (крыса, человек)  
 Сарафотоксин S6 a1 (змея)  
 Сарафотоксин S6 a11 (змея)  
 Сарафотоксин S6 с (змея)  
 сарафотоксин S6 b (змея)  
 Сарафотоксин S6-D (змея)  
 Бибротоксин (змея)

**C**C**S**S**L**M**D**K**E**C**V****F**C**H**L**D**I**I****W**  
**C**C**S**S**W**L**D**K**E**C**V****W****F**C**H**L**D**I**I****W**  
**C**T**C**F**T**Y**K****D**K**E**C**V**Y**Y**C**H**L**D**I**I****W**  
**C**S**C**K**D**M**T****D**K**E**C**L**N**F**C**H**Q**D**V**I****W**  
**C**S**C**K**D**M**S****D**K**E**C**L**N**F**C**H**Q**D**V**I****W**  
**C**T**C**N**D**M**T****D**E**E**C**L**N**F**C**H**Q**D**V**I****W**  
**C**S**C**K**D**M**T****D**K**E**C**L**Y**F**C**H**Q**D**V**I****W**  
**C**T**C**K**D**M**T****D**K**E**C**L**Y**F**C**H**Q**D**I**I****W**  
**C**S**C**A**D**M**T****D**K**E**C**L**Y**F**C**H**Q**D**V**I****W**

## Первичные структуры структурно-гомологичного семейства эндотелинов млекопитающих и токсинов змей



Пространственная структура  
 сосудосокращающего пептида  
 эндотелина-1 человека



Пространственная структура  
 сарафотоксина 6b израильской змеи  
*Atractaspis engaddesis*



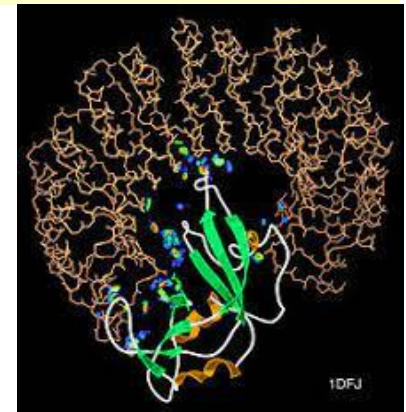
# Белок-белковые взаимодействия (РРІ)

Большинство клеточных процессов осуществляются белковыми машинами или совокупностями десяти и более белков.

Белки могут «временно» связываться друг с другом или же образовывать «стабильные» мультибелковые комплексы. При этом белковые комплексы могут быть как гетеро-, так и гомоолигомерными.

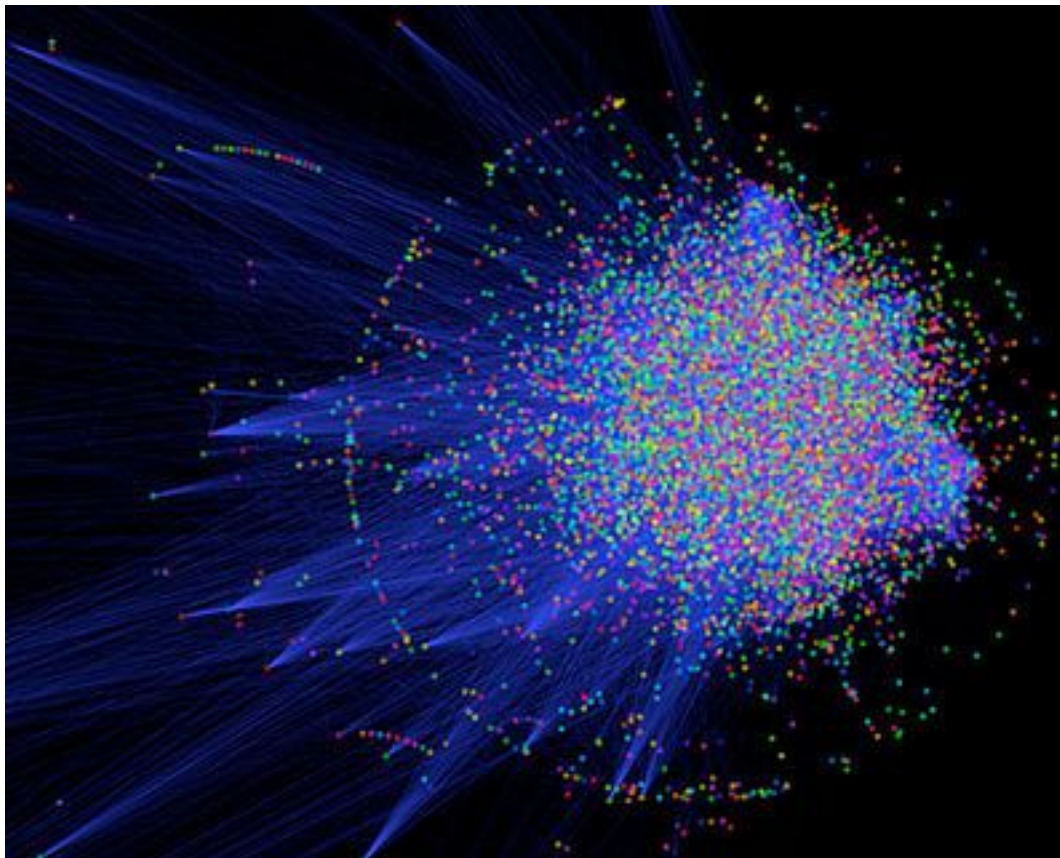
Классическими примерами ББВ являются взаимодействия фермент-ингибитор и антитело-антиген, но помимо них ББВ могут возникать между двумя доменами или же доменом и пептидом.

Эти межбелковые взаимодействия важны по отношению ко всем клеточным процессам, и понимание их является ключевым к пониманию любой биологической системы.



Белок-белковое взаимодействие подковообразного ингибитора рибонуклеазы (показана каркасная модель) с рибонуклеазой.

Напомню, что совокупность (компендиум) всех биологически значимых физических протеин-протеин взаимодействий (PPIs) для данной клетки или организма называют ***интерактомом***.



**Интерактом – сложная биомолекулярная сеть, которая должна быть:**

- **точно картирована** (найлены все PPI, которые имеют место в клетке),
- **исследована** (найти для любого белка его взаимодействия),
- **проанализирована** (измерить параметры сети).

Визуализация интерактома человека, где точки обозначают белки, а соединяющие их синие линии — взаимодействия между белками.



# Белок-белковые взаимодействия (PPI)

## PPI методы

### Экспериментальные

Двугибридная дрожжевая система  
Ко-иммунопреципитация  
Масс-спектрометрия  
Рентгеновская кристаллография  
ЯМР–спектроскопия

### Биоинформатические

#### Геномный контекст

Филогенетические профили  
Консервативность геного окружения  
Слияние генов

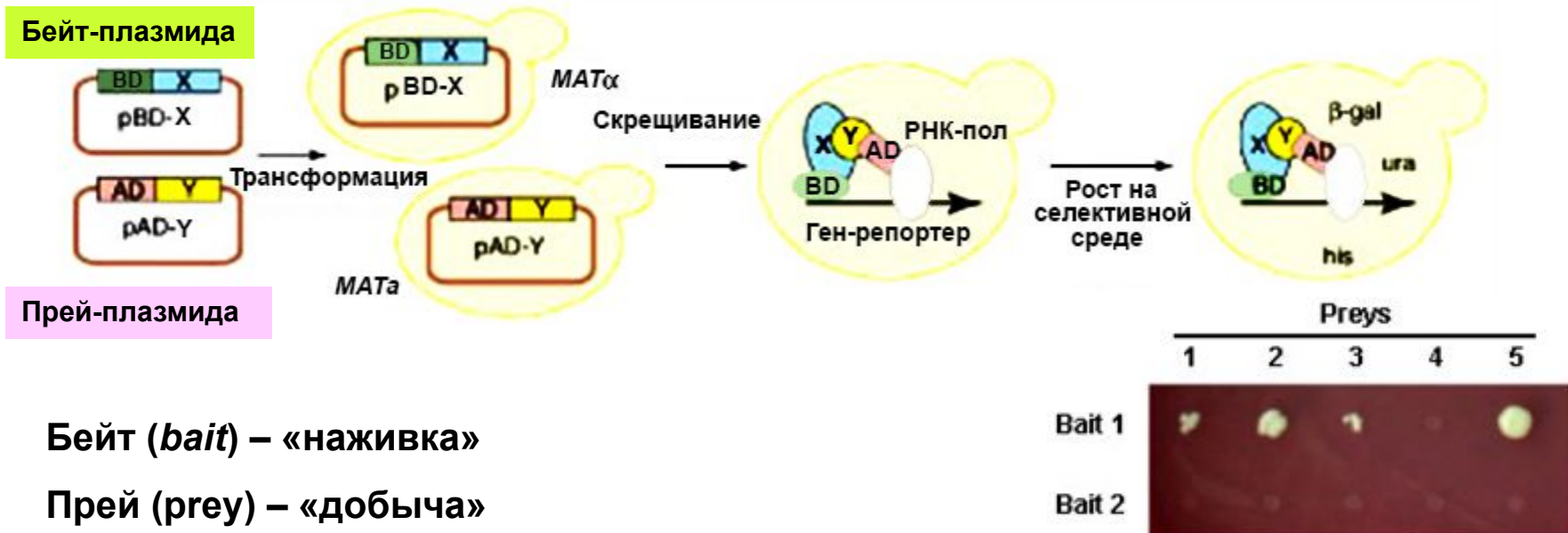
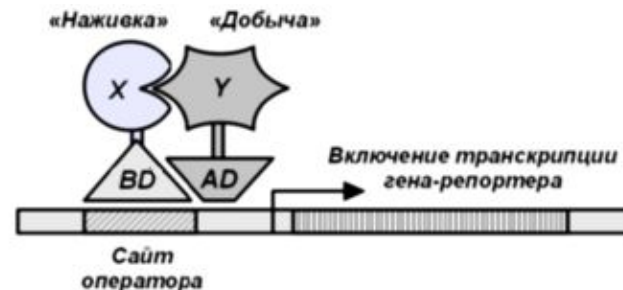
#### Из последовательности и структуры

Скоррелированные мутации  
Сходство филогенетических деревьев  
HMM, MSA, Motif  
Эволюционное отслеживание  
Анализ поверхностных участков, стыковки

# Двугибридный метод (2H method)

Высоко-производительные двугибридные системы (2H):

- Y2H-дрожжевая двугибридная система, в клетках дрожжей

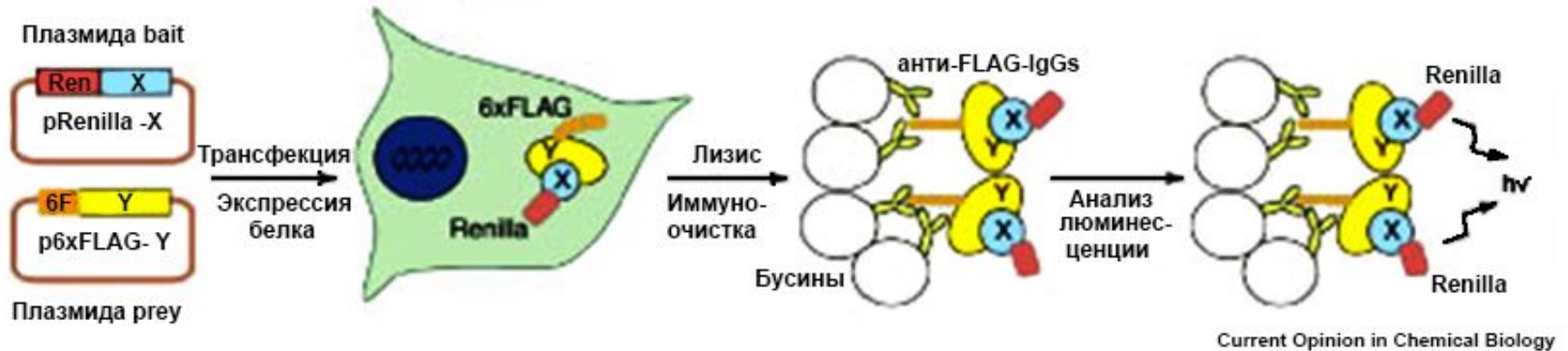


Бейт (*bait*) – «наживка»

Прей (*prey*) – «добыча»

Анализ результата

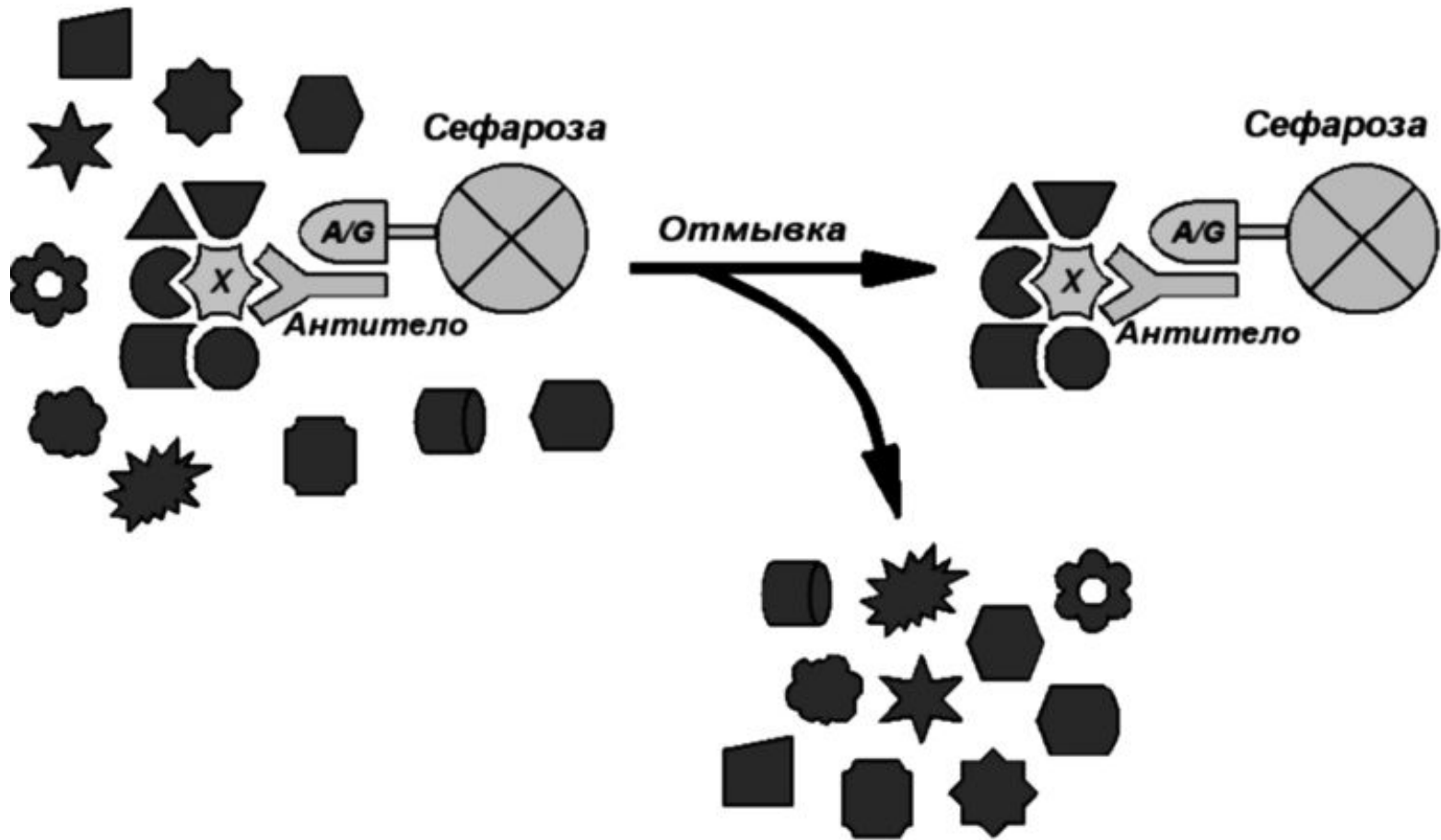
**- LUMIER – система на основе люминесценции (люцифераза) в клетках млекопитающих**



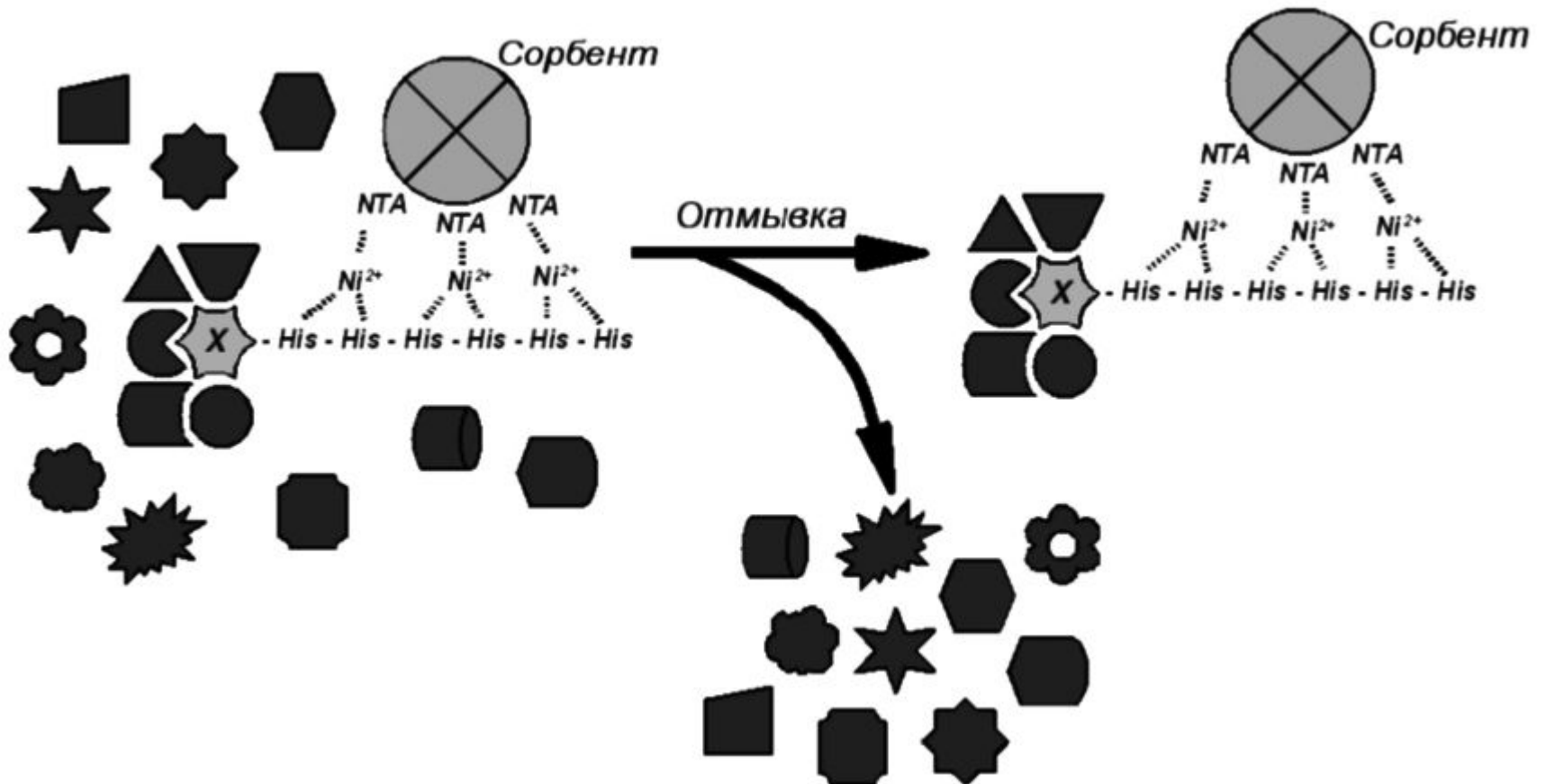
***Renilla luciferase plasmid***

**FLAG - эпитоп**

## Принцип выделения белковых комплексов методом коиммунопреципитации

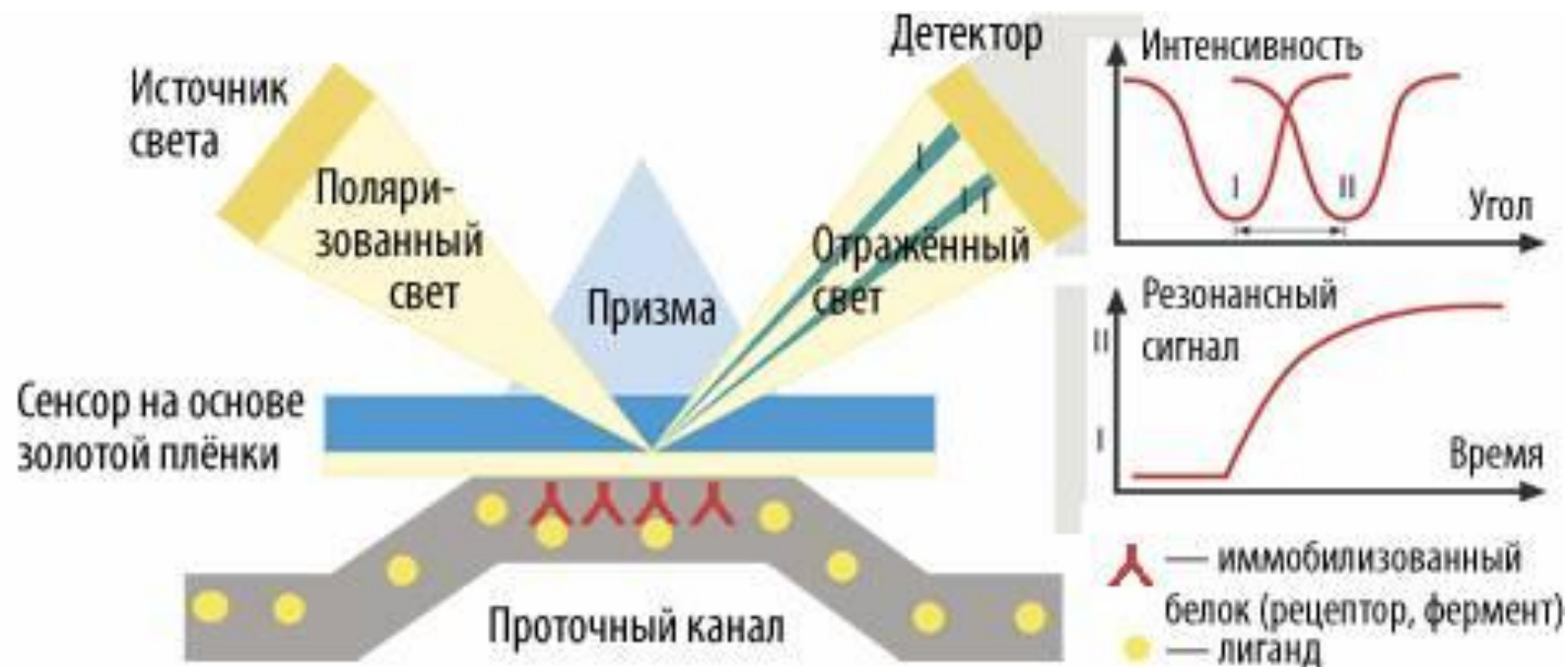


## Принцип тандемной аффинной очистки целевого белка в комплексе с белками-партнерами (*Tandem Affinity Purification, TAP*)

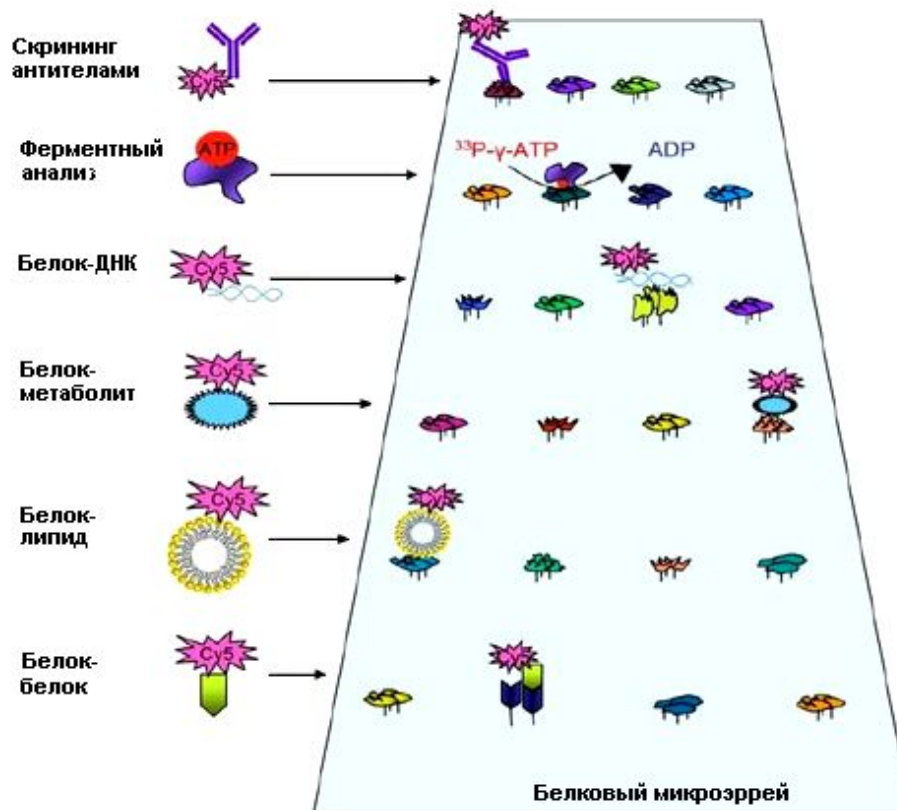


Принцип аффинного выделения 6xHis-меченого белка в комплексе с белками-партнерами

## Методы ЯМР в исследовании биомолекулярных комплексов



# Белковый микроэрей



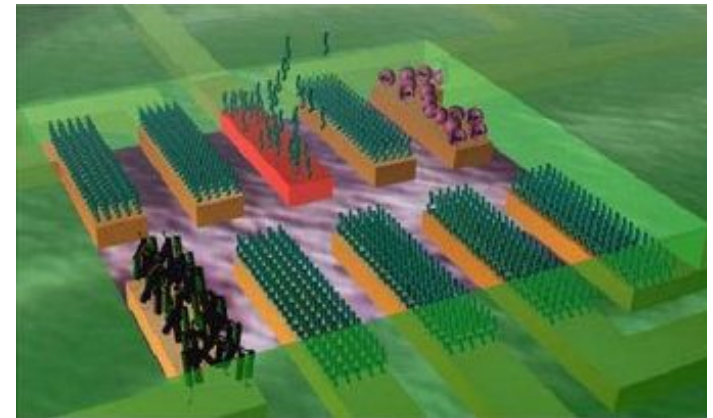
Белковый микрочип - это технология, когда на твердую подложку (основание) в различных точках ковалентно пришиваются тысячи различных белков (антигены, антитела, ферменты и т. д.). Каждый отдельный белок формирует область с высокой концентрацией на микрочипе. Данная технология очень схожа с технологией ДНК-микрочипа, только в качестве зондов выступают не молекулы однонитевой ДНК, а белки.

# Белковый микроэррей

## Типы белкового микроэррея

В настоящее время для изучения биохимической активности белков используются три типа белкового микроэррея:

- ❖ Аналитический микроэррей (AM)
- ❖ Функциональный микроэррей (FM)
- ❖ Микроэррей обратной фазы (RPM)





## **Аналитический микроэррей**

- ❑ **Различные типы лигандов, включая антитела, антигены, ДНК- или РНК-аптамеры, углеводы или маленькие молекулы (метаболиты), с высоким сродством (аффинностью) и специфичностью наносятся пятнами на производную поверхность.**
- ❑ **Образцы белков из двух биологических состояний для сравнения отдельно метятся красным или зеленым флуоресцентным красителем, смешиваются и инкубируются на чипе. Пятна в красном или зеленом цвете идентифицируют избыток белков из одного состояния над другим.**

**Эти типы микроэррея могут быть использованы для мониторинга дифференциальных профилей экспрессии и для клинической диагностики. Примеры включают профилирование ответов на стрессы окружающей среды и сравнение здоровых и больных тканей.**

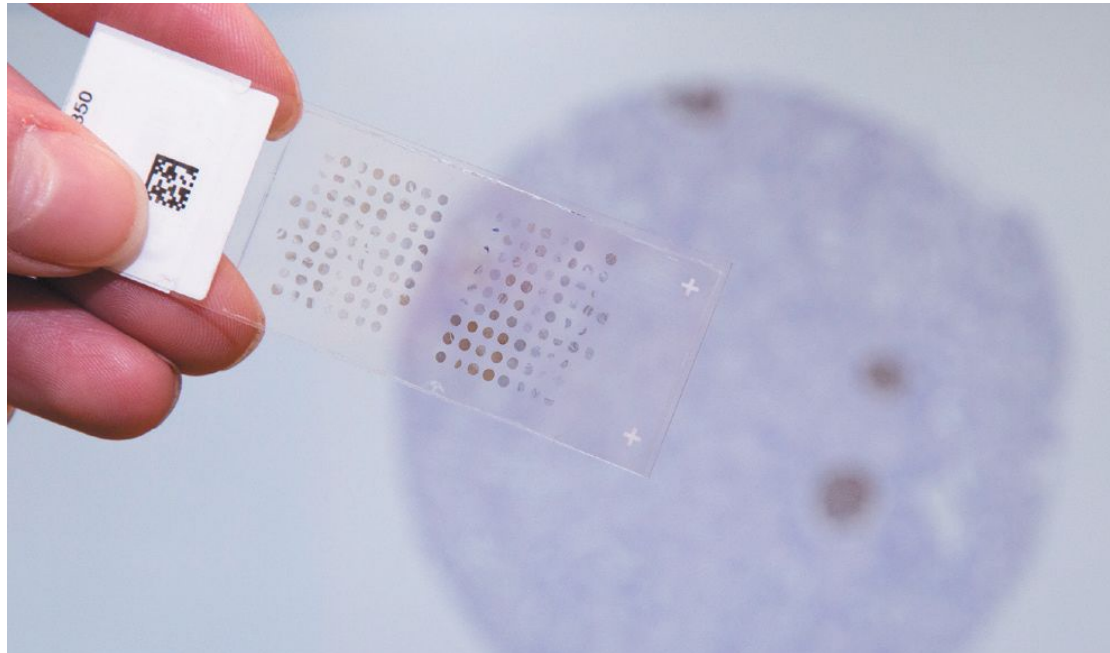
## **Функциональный белковый микроэррей (FM)**

**Нативные белки или пептиды индивидуально очищаются или синтезируются используя высоко-производительные подходы и в массе наносятся на доступную поверхность для формирования функционального белкового микроэррея.**

**Эти чипы используются для анализа белковой активности, связывающих свойств и посттрансляционных модификаций.**

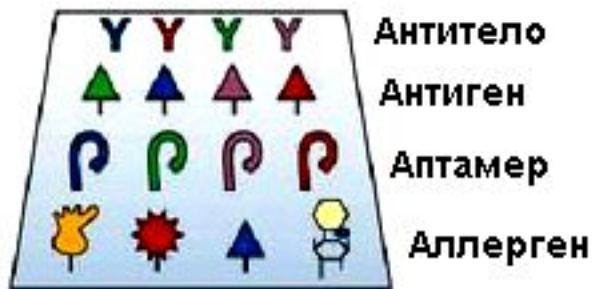
**Функциональный белковый микроэрей может быть использован для идентификации субстратов исследуемых ферментов.**

**Этот класс чипов особенно полезен в идентификации лекарств и мишеней лекарств и в построении биологических сетей.**

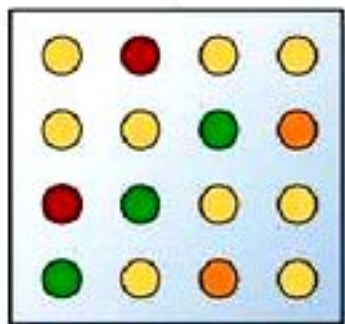


# Аналитический микроэрей по сравнению с функциональным белковым

## АНАЛИТИЧЕСКИЙ



Серологические пробы  
Клеточные лизаты  
Живые клетки

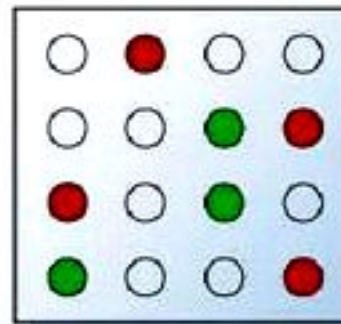


Уровень экспрессии белков  
Белковый профиль  
Диагностика

## ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ



Белковые зонды  
Нуклеиновые зонды  
Лекарственные зонды  
Ферменты



Связывающие свойства белка  
Построение пути синтеза  
Обнаружение лекарств  
Посттрансляционные модификации

Функциональные белковые микроэрей отличается от аналитического в том, что функциональные белковые микроматрицы состояются из массивов содержащих полноразмерные функциональные белки или белковые домены.

# Протеиновый микроэрей обратной фазы (RPA)

- ❖ В RPA из различных исследуемых тканей изолируются клетки и лизируются.

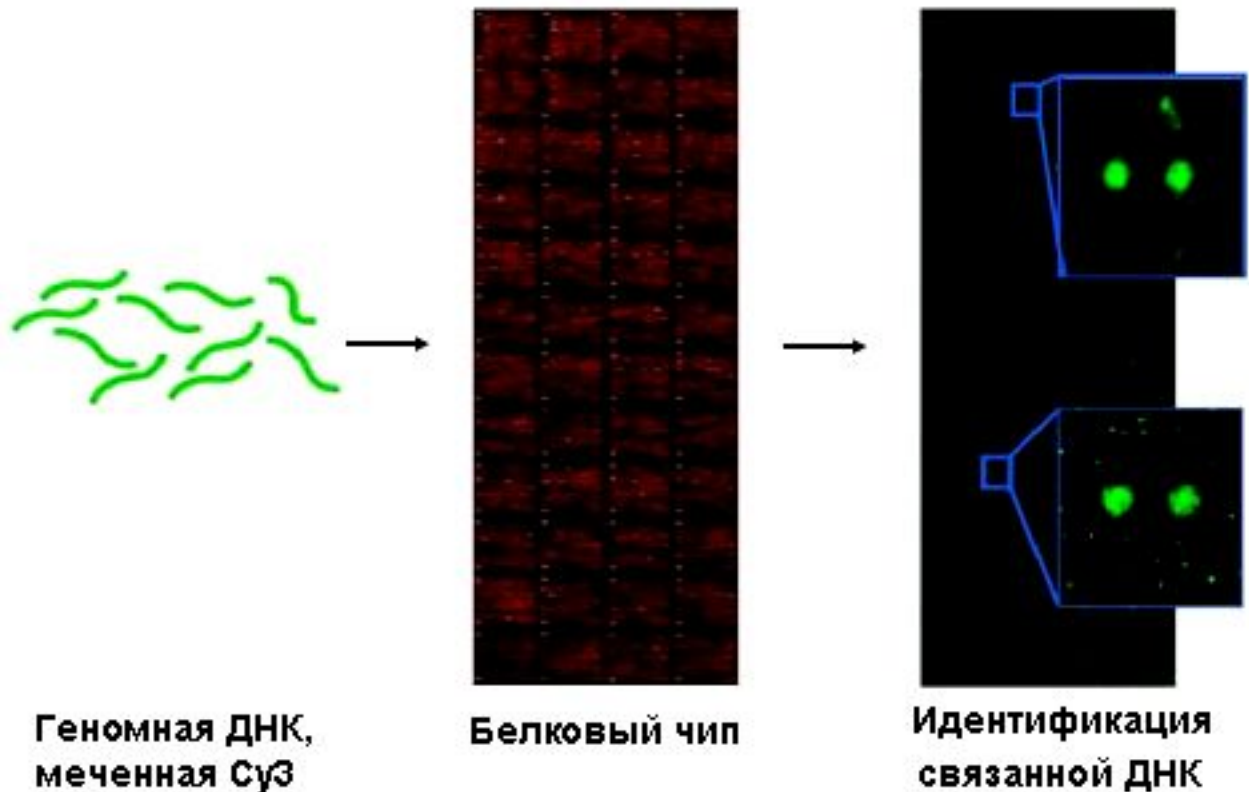
Лизаты наносятся массивом на нитроцеллюлозный слайд, используя контактный штырьковый прибор. Слайды затем исследуются с антителами против целевого белка и антитела детектируются хемилюминесцентным, флуоресцентным или колориметрическим анализом.



RPA позволяет определить присутствие измененных белков, что может быть свидетельством болезни.

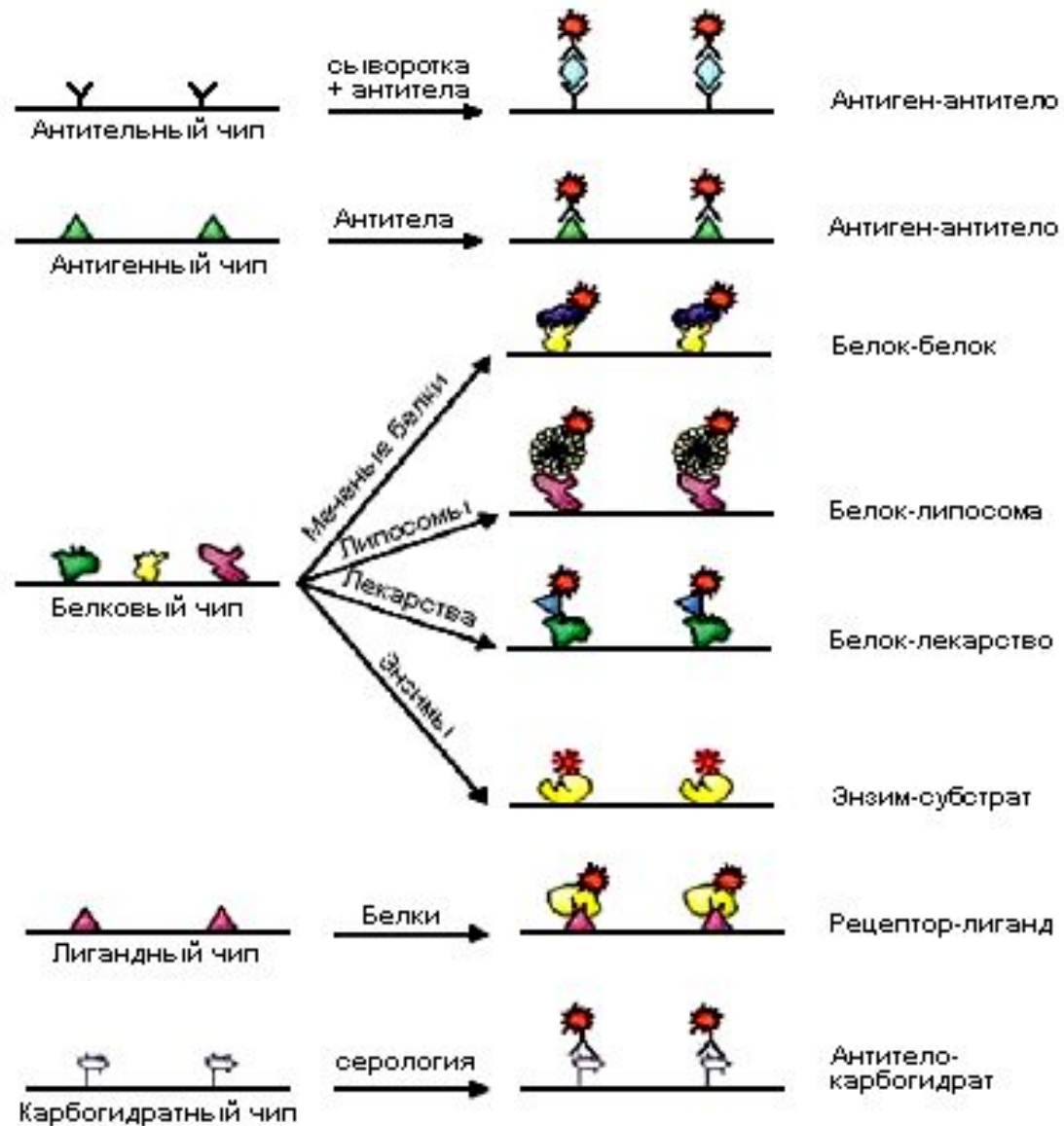
Особенно, пост-трансляционные модификации, которые обычно изменяются в результате заболевания, могут быть обнаружены RPA.

Эти белковые чипы используются для изучения биохимических активностей целого протеома в единичном эксперименте.

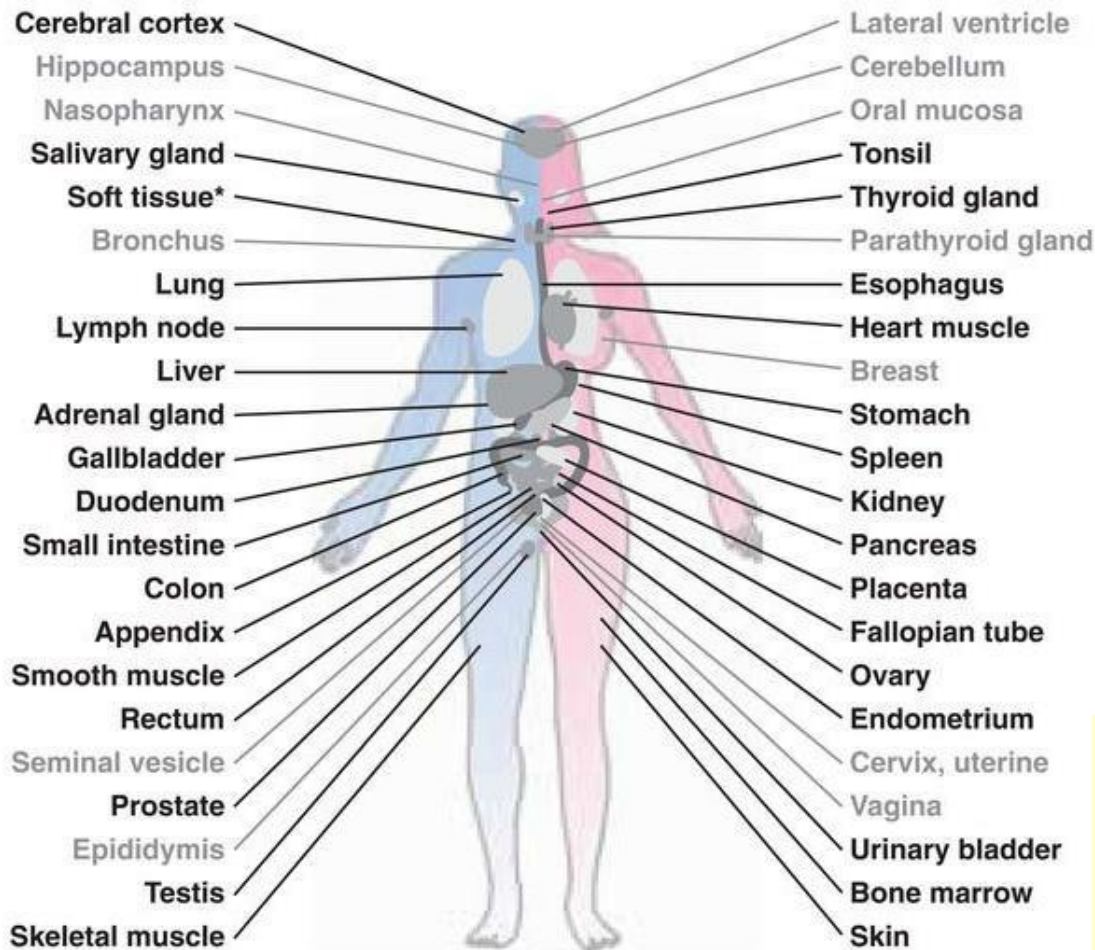


Они используются для изучения ряда белковых взаимодействий, таких как белок-белок, белок-ДНК, белок-РНК, белок-фосфолипид и белок-маленькая молекула.

# БЕЛКОВЫЕ ЧИПЫ



# Ткани и органы человека, для которых составлены списки белков и оценено их относительное количество



## Атлас белков человека

Серым цветом отмечены ткани, где применялись только иммуногистохимические методы (только для белков), а черным — те, для которых проводились и определения белков, и их мРНК.

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000265681-RPL17/tissue>

- ribosomal protein RPL17

*M. Uhlén, L. Fagerberg, Björn M. Hallström, C. Lindskog, et al. Tissue-based map of the human proteome //Science. 2015. V. 347. P. 394.*

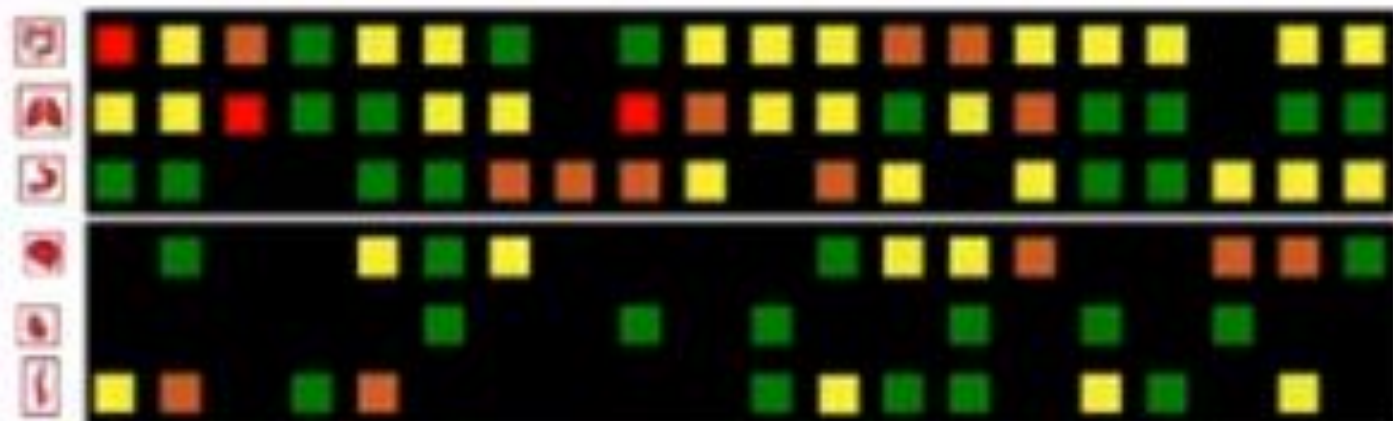
# ЧТО ТАКОЕ ПРОТЕОМ ЧЕЛОВЕКА?



**КАТАЛОГ**  
(ПЕРЕЧЕНЬ  
БЕЛКОВ)

NARS  
ACAA2  
DOK6  
SOC56  
ATP5A1  
SERPINB13  
ELP2  
LOC272960  
FAM69C  
CDH19  
GNAL  
RAB27B  
CDH2  
DSC1  
NPC1  
CYB5A  
TYMS  
FECH  
AFG3L2  
NDUFV2

**ПРОТЕОМ**  
(СОДЕРЖАНИЕ  
БЕЛКА  
В ТКАНЕ ИЛИ  
ОРГАНЕ)



high medium low undetected



## Классификация белок-кодирующих генов, основанная на экспрессирующейся РНК



## Белки «домашнего хозяйства»

Транскриптомный анализ образцов, представляющих все основные органы и ткани организма человека, выявил 8874 кодирующих белок гена, обнаруженных во всех проанализированных тканях.

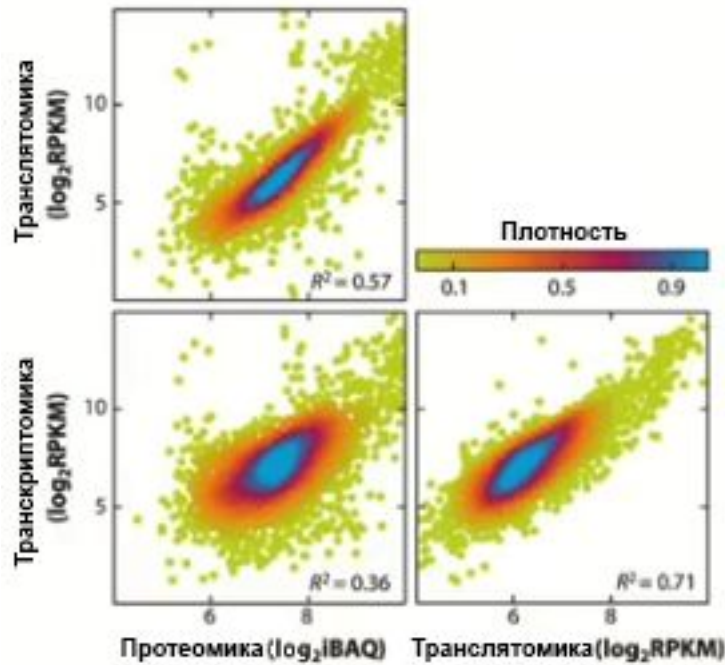
«Домашние белки» существуют во всех классах белков, но некоторые классы явно пересыщены.

Примеры классов белков домашнего хозяйства

Класс белков	Число генов	Число генов, экспрессируемых во всех тканях
Рибосомальные белки	153	146
Митохондриальные белки	781	644
Белки, связанные с РНК-полимеразой	33	32
Белки, связанные с циклом Кребса	30	26
Белки, связанные с цитоскелетом	369	192

Понятный класс белков домашнего хозяйства - это те, которые участвуют в генетическом механизме экспрессии генов, например, РНК-полимеразы и рибосомные белки, необходимые для транскрибирования и трансляции ДНК в белки. Интуитивно понятно, что без этих генов клетка и организм вообще не могут функционировать.

# Сравнительный анализ транскриптомов, протеомов и транслятомов в клетках млекопитающих



Показана важная роль транслятного уровня регуляции экспрессии в реализации генетической информации и формировании клеточного протеома в разных органах эволюционно удаленных видов животных.

Транскриптом клеток (совокупность мРНК) не определяет автоматически состав клеточного протеома (совокупности белков).

Дифференциальная трансляция мРНК на рибосомах вносит существенный вклад в формирование протеома.

Поэтому транслятом (совокупность мРНК, транслируемых на рибосомах в данный момент), является важным промежуточным этапом в реализации генетической информации.

Транслятом количественно характеризуют с помощью метода рибосомного профайлинга (Ribo-seq), основанного на изоляции защищённых рибосомами фрагментов мРНК от остальных видов клеточной РНК с последующим их секвенированием.

Были получены данные RNA-seq и Ribo-seq для трёх органов (мозг, печень, семенники), формирующихся из разных зародышевых листков, пяти видов млекопитающих (человек, макака, мышь, опоссум и утконос) и курицы.

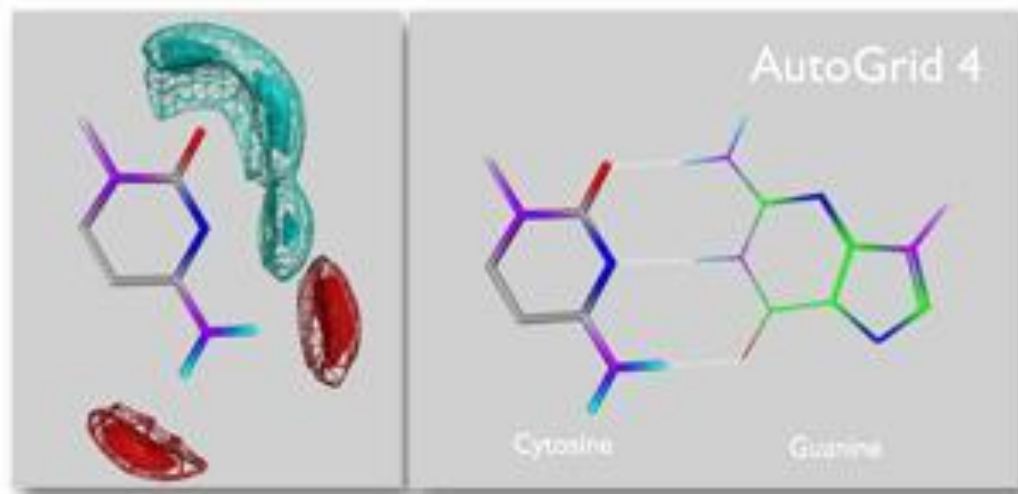
# Практическая протеомика



**Докинг** – одна из самых главных и важных стадий процесса компьютерного моделирования лекарств.

## Основная задача докинга –

построение модели структуры комплекса молекулы лиганда (биологически активного вещества) и молекулы рецептора (биомишени). Обычно молекула рецептора представляет собой белковую макромолекулу, а молекула лиганда – малую молекулу. Реже встречаются примеры белок-белкового докинга.



AutoDock – программа для автоматического докинга. С помощью этой программы можно посмотреть как молекулы лекарств или кандидатов на роль лекарств взаимодействуют в известной 3D-структуре.

# Применение в биологии

**Протеомные карты** – начальная точка для главного исследования в геномике.

## Изучаемые вопросы:

Как много генома транскрибируется и транслируется в живом организме?

Какое действие оказывают на протеом разные условия роста?

## **исследования продолжаются на**

эукариотах, таких как человек: интенсивно модифицируют белки, отщепляя их N- и C- концы; декорируют их сахарами и/или фосфатами, сульфатами и другими PTMs

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*...

Плодовая мушка *Drosophilla melanogaster*, ...

Растение *Arabidopsis thaliana*, ...

и многие другие ...

## Улучшение сельскохозяйственных продуктов

- Конструирование устойчивости к патогенам / паразитам разных растений;  
большинство из этих механизмов устойчивости включают экспрессию токсичных или защитных белков;
- Открытие новых токсичных или защитных белков;
- Протеомный проект по шерсти для изучения экономически важных характеристик, таких как цвет и прочность волокна.
  
- Оценка дополнительных сельскохозяйственных продуктов:
  - а. переработка продуктов низкого значения,
  - б. протеинизация молочной сыворотки как побочного продукта сыроделия (исследование может ли эта сыворотка использоваться для выращивания рекомбинантных бактерий для биотехнологического производства).

## Контроль качества

- Является ли фарш, продаваемый как говяжий, действительно говяжьим, или смесью говядины и ...
- Протеомные технологии обеспечивают новый уровень точности в определении белок-содержащих продуктов.

# Судебной медицине, Микробиологии, Эпидемиологии, Таксономии

## Отслеживание сложности

- взаимодействий хозяин-патоген или хозяин-паразит:

например: фиксация азота у бобовых путем ассоциации с бактериями (*Rhizobium*) для формирования узелков; инфицирование льна ржавчиной льна.

## Иммуногенные белки

- идентификация белковых агентов, вызывающих болезни, которые распознаются иммунной системой

(вакцин-кандидатов для микробных патогенов, напр.: инфекции *Chlamydia trachomatis*);

- исследование аллергии: пыльца каких трав является наиболее иммуногенной; идентификация аллергенов (белков) в латексе (перчатки) 2Д PAGE, используя латекс как образец.

## Токсикология и фармацевтика

- Множественные перекрывающиеся пути метаболизма нарушаются токсинами или лекарствами: одновременная идентификация, характеристика и количественная оценка ряда генных продуктов и ПТМ; массивно-параллельный подход, предлагаемый протеомикой.



- Ретиноевая кислота (использовали в дерматологии и онкогематологии)  
ацилирование белков ретиноевой кислотой (РТМ) и определение этих  
ацилированных белков методами протеомики.

- Фосфорилирование

сигналы биохимических путей «в» или «из» киназами и фосфатазами,  
сложные сети

- и т. п.

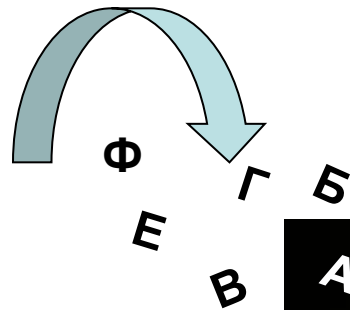
## **Рак**

Канцерогенные продукты действуют подобно фармакологическим  
агентам, нарушая РТМ и уровень экспрессии ряда белков

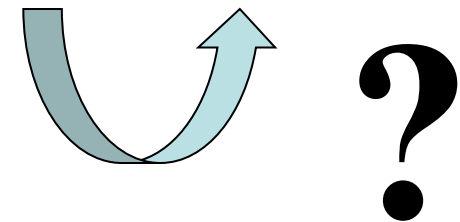
- изменения онкогенных продуктов и модификации специфических  
белков клеточного цикла играют важную роль в генезисе опухоли и  
развитии рака

Исследования продолжаются на мозге, щитовидной железе, груди,  
легких, почках, мочевом пузыре, яичниках, костном мозге.

# Заключение



Если все буквы «Война и мир»  
высыпать в мешок и затем  
пытаться наугад вытаскивая их  
воспроизвести сцену первого  
бала Наташи Ростовой –  
задача, сравнимая с задачами  
геномики и протеомики.  
(Извините, не помню, кто сказал)



**Вам, есть чем  
заняться!  
Успехов!!!**

## **Вопрос на зачет:**

**Понятно ли (хотя бы в общих чертах), чем занимается геномика и протеомика, и чем ее методы исследования отличаются от методов догеномного периода?**