

Инновационные исследования в протеомике

ПРОТЕОМИКА – наука, изучающая белковый набор организма, а также структуру белков (в т.ч. пространственную структуру) и их функции

■ Протеомика - это изучение белков и их взаимодействия в живых организмах, в том числе в человеческом. Ученые в области протеомики исследуют "производство" протеинов (белков), их декомпозицию и замену белков внутри тела. Они также изучают как протеины модифицируются после их генерации в организме. Слово «протеом» образовано от слова «протеин» (белок) и окончание слова «геном», так что в самом названии как бы слиты воедино белок и геном (ДНК).

В этой быстро развивающейся области основным вызовом является понимание механизма взаимодействия около 300,000 протеинов в человеческом организме.

Задачей протеомики является проанализировать белок, установить его последовательность, соотнести с банком данных, сделать рентген и установить структуру. Именно протеомика положила начало биоинформатике, т.к. электронный анализ веществ без “интеллектуального сравнения” занял бы десятки, а то и сотни лет.

ПРОТЕОМИКА

- Протеомика может помочь идентифицировать и оценить новые целевые протеины гораздо эффективнее и с систематизированным подходом, что, в свою очередь, может ускорить разработку новых диагностик и терапевтических средств.
- По некоторым оценкам число протеинов в человеческом теле около 300,000 или больше - в 10 раз больше, чем количество генов в человеческом теле. Эти протеины, конечно, могут взаимодействовать друг с другом и число таких взаимодействий не поддается подсчету.

Медицинские аспекты протеомики

Часто протеины требуют модификации после трансляции (т.е. после создания по плану ДНК) для того, чтобы способствовать выполнению ими определенных функций в организме. Например, протеины, которые вызывают образование кровяных тромбов остаются неактивными до тех пор, пока не претерпевают соответствующих изменений. Следовательно, неправильная послетрансляционная модификация является второй причиной неправильного функционирования протеинов.

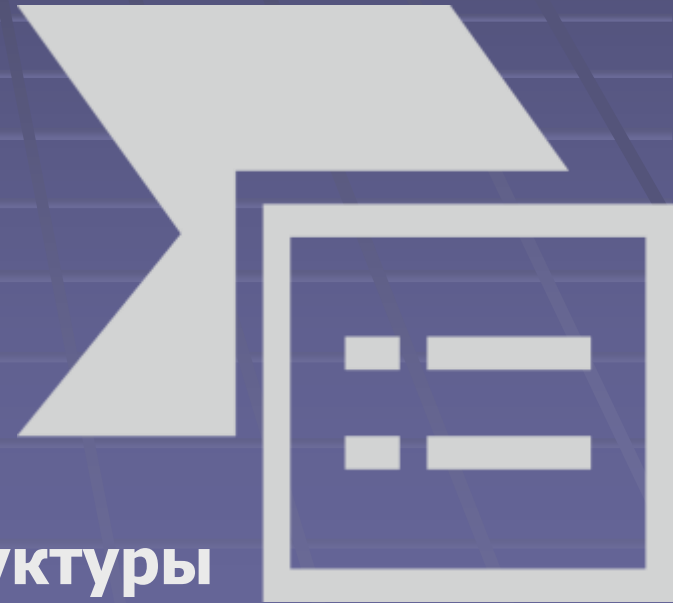
Медицинские аспекты протеомики

Полиморфизм белков- еще одна причина проблем с протеинами. Это небольшие вариации ДНК, которые делают индивидуальных живых особей отличными друг от друга. Этот же полиморфизм также делает некоторые особи более склонными к определенным болезням и эта склонность неизбежно прослеживается до ненормальности генерации и взаимодействия протеинов.

Рентгеноструктурный анализ белков

В настоящее время рентгеноструктурный анализ (РСА) является основным методом определения пространственной структуры биологических макромолекул (белков, вирусов, нуклеиновых кислот) и их комплексов при атомном разрешении. Процедура расшифровки структуры этим методом является сложным и дорогостоящим процессом, включающим в себя:

- а) выделение и очистку белка;
- б) кристаллизацию очищенного белка;
- в) рентгеноструктурный эксперимент;
- г) компьютерную расшифровку структуры белка.



Компьютерная часть является одной из составляющей процесса расшифровки структуры, т.к. данные, полученные в рентгеновском эксперименте, содержат только часть информации, необходимой для реконструкции распределения плотности в молекуле белка. Эксперимент позволяет определить лишь интенсивности лучей, рассеянных под различными углами по отношению к исследуемому образцу. А это десятки и сотни тысяч измерений. Однако для восстановления структуры надо знать также и значения сдвигов фаз рассеянных лучей. Эти сдвиги фаз не могут быть зарегистрированы экспериментально.

Существующие в макромолекулярной кристаллографии подходы к решению этой проблемы основаны либо на получении химическим путем изоморфных модификаций исследуемого белка и проведения с ними дополнительных рентгеновских экспериментов, либо на наличии в белке аномально рассеивающих атомов, либо на известной структуре белка, гомологичного исследуемому. Такая дополнительная информация позволяет получить приближенные значения фаз рассеянных лучей и затем приближенные значения координат атомов в исследуемом объекте. Полученные координаты подвергаются уточнению, которое представляет собой сложную вычислительную задачу и сводится к поиску локального минимума в пространстве 10^4 - 10^6 переменных.

действия белков и их целенаправленной модификации необходимо определение их пространственного строения и динамических конформационных характеристик в условиях максимального приближения к физиологической среде. Наиболее эффективным методом решения этих задач является спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР). В Институте биоорганической химии РАН (ИБХ РАН) расшифрованы структуры десятков белков, разрабатываются компьютерные методы анализа с использованием параллельных вычислений, позволяющие значительно ускорить этот процесс

Технология

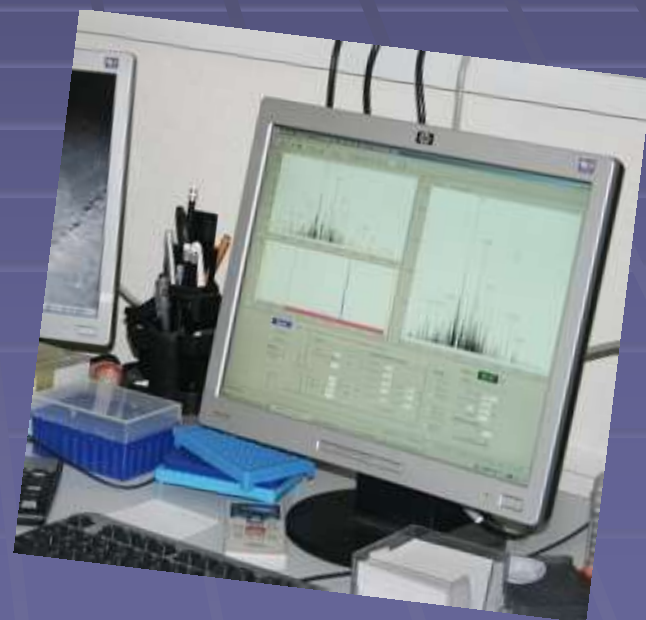
Хроматография, масс-спектрометрия и программные продукты - это основные инструменты в области протеомики.

В настоящее время большая часть работ в протеомике выполняется с использованием 2-D PAGE (двумерного гель-электрофореза на полиакриламиде).

Методы, комбинирующие высокоэффективную жидкостную хроматографию и тандемную масс-спектрометрию могут обеспечить быстрый прорыв в протеомике.



Система жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии Agilent - один из основных инструментов протеомики



Масс-спектрометрия играет ключевую роль в идентификации белков и их характеристике. Большинство ученых, вовлеченных в протеомные исследования, склонны к использованию метода ионизации лазерной десорбцией в матрице с времяпролетным масс-анализатором (MALDI TOF), используемого в сочетании с двумерным геле-электрофорезом (2D-PAGE).

Масс-спектрометрия с использованием ионных ловушек способна эффективно собирать ионы и выполнять высокоинформативную фрагментацию. Построенный на основе ионной ловушки масс-анализатор лучше всего подходит для "скорострельной" секвенации белков.

Прежде чем начинать анализ на ионной ловушке пептиды разделяются ВЭЖХ, что сокращает сложность смеси. В белковой вытяжке из пятна может оказаться огромное количество пептидов, а смеси часто содержат их модификации.

Средний белок может давать 20 - 50 пептидов. Когда измерения сложных смесей пептидов, которые могут плохо ионизоваться, проводятся на MALDI-TOF, можно и не распознать достаточное количество пептидов для идентификации белка методом сравнения по базам данных пептидов.

«Скорострельное» секвенирование белков

Метод скорострельного секвенирования (shotgun sequencing) белков является методом, который быстрее всех сможет идентифицировать и характеризовать все белки человеческого тела

Методика скорострельного секвенирования, использованная для генома человека, включала клонирование ДНК по технологии полимеразной цепной реакции (ПЦР, PCR, Hoffman-La Roche, Nutely, NJ). Исследователи химически раскололи весь геном на фрагменты по 2 - 10 килобаз. Каждая из четырех баз в ДНК - аденин, тимин, цитозин и гуанин - химически модифицировалась так, чтобы флуоресцировать своим собственным уникальным цветом. Затем проводилась сепарация на геле и с помощью лазерных сканеров определялась последовательность баз по их цвету. Информация о последовательности была задана сверхмощным компьютерам, которые держали в памяти откуда происходят фрагменты и прослеживали информацию по сканированиям для того, чтобы расставить фрагменты в правильном порядке. Таким образом был секвенирован весь геном. Это был весьма ловкий ход, но скорострельное секвенирование белков - это совсем не то же самое, что секвенирование генома.

белки состоят из 20 аминокислот, а не только из четырех баз, следовательно, являются намного более сложными объектами. Они не могут быть клонированы и получение и работа с образцами гораздо сложнее. Также белки варьируются в широких пределах и их структура непредсказуема подобно генам. Процесс скорострельного секвенирования более сложен. Для того, чтобы достичь результатов по секвенированию в протеомике, белок должен быть разрушен до пептидов, которые затем делятся, ионизируются и детектируются методом масс-спектрометрии. Идентификация белков выполняется либо путем поиска информации по масс-спектрам пептидов с использованием известных баз данных или методом интерпретации для тех пептидов, которые еще не внесены в базы данных. Кроме всего прочего, в отличие от генов белки не статичны. Они изменяются и по интенсивности и по концентрации.

Использование ловушек позволяет фрагментировать пептиды столько раз, сколько это надо для их идентификации с высокой степенью специфичности.

Ученые предлагают систему масс-спектрометра, называемую *Dynamic Exclusion™*, расширяющую возможности для протеинного анализа: сначала измеряют присутствие относительно интенсивных пиков пептидов в полном масс-спектре. В порядке убывающей интенсивности один за другим ионы изолируются в ионной ловушке и записывается спектр фрагментацией этих выбранных ионов. Сначала изолируется и фрагментируется наиболее интенсивный ион, затем, следующий по интенсивности, затем третий, и так продолжается до тех пор, пока даже низко интенсивные ионы пептидов не будут исследованы в автоматическом режиме. Это позволяет выполнять высокопроизводительный и автоматический анализ белков, а также определять все после-трансляционные

Автоматизированные системы анализа белков

Система высокоэффективной жидкостной хроматографии [Surveyor LC](#), соединенная с мощнейшим программным обеспечением [Xcalibur](#) для ВЭЖХ/МСп, создает ядро всех подобных систем. Система ВЭЖХ [Surveyor LC](#) включает в себя модуль подготовки растворителей - [Solvent Platform](#), насос Surveyor MS Pump со встроенным дегазатором, автодозатор [Surveyor Autosampler](#) и детектор фото-диодная матрица [Surveyor PDA](#). Модульная система вертикального построения занимает всего 14 дюймов (35.56 см.) пространства стола

Автоматизированные системы анализа белков

LTQ FT - самый мощный прибор для идентификации пептидов и белков. LTQ FT это гибридный масс-спектрометр, соединяющий в себе возможности выделения ионов и многомерного масс-спектрометрического анализа в линейной квадрупольной ионной ловушке с высочайшим разрешением и точностью определения массы на масс-спектрометре ионно-циклотронного резонанса. Это единственный прибор, позволяющий проводить анализ целых белков (так называемая, Top-down протеомика). Измерение точных масс позволяет однозначно определять массы фрагментов пептидов, а высокое разрешение делает возможным определять состояние заряда полипротонированных ионов. Пока не существует в мире более мощного прибора для решения задач протеомики, метаболомики и липидомики чем LTQ FT

Автоматизированные системы анализа белков

TurboSEQUENT™ - **новый пакет программного обеспечения для автоматической идентификации протеинов. Обеспечивает быструю и точнейшую идентификацию даже при низких концентрациях белков в сложных смесях.**