Dolomatov S.I., Kazakova V.V., Zukow W. Proteomics. Journal of Education, Health and Sport. 2021;11(12):158-189. (1-32). eISSN 2391-8306. DOI http://dx.doi.org/10.12775/JEHS.2021.11.12.011
https://apcz.umk.pl/JEHS/article/view/JEHS.2021.11.12.011
https://zenodo.org/record/5780423

The journal has had 40 points in Ministry of Education and Science of Poland parametric evaluation. Annex to the announcement of the Minister of Education and Science of December 1, 2021. No. 32343.
Has a Journal's Unique Identifier: 201159. Scientific disciplines assigned: Physical Culture Sciences (Field of Medical sciences and health sciences); Health Sciences (Field of Medical Sciences and Health Sciences).

Punkty Ministerialne z 2019 - aktualny rok 40 punktów. Załącznik do komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 1 grudnia 2021 r. Lp. 32343. Posiada Unikatowy Identyfikator Czasopisma: 201159.
Przypisane dyscypliny naukowe:Nauki o kulturze fizycznej (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu); Nauki o zdrowiu (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu).

© The Authors 2021;
This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Nicolaus Copernicus University in Torun, Poland
Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author (s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non commercial license Share alike.
(http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Received: 25.11.2021. Revised: 30.11.2021. Accepted: 14.12.2021.

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska
Wydział Nauk o Ziemi i Gospodarki Przestrzennej

Доломатов С.И., Казакова В.В., Жуков В.А.

Методическое пособие

ПРОТЕОМИКА

Toruń 2021

Dolomatov S.I., Kazakova V.V., Zukow W. Proteomics. Journal of Education, Health and Sport. 2021;11(12):158-189. (1-32). eISSN 2391-8306. DOI http://dx.doi.org/10.12775/JEHS.2021.11.12.011
https://apcz.umk.pl/JEHS/article/view/JEHS.2021.11.12.011
https://zenodo.org/record/5780423

The journal has had 40 points in Ministry of Education and Science of Poland parametric evaluation. Annex to the announcement of the Minister of Education and Science of December 1, 2021. No. 32343.
Has a Journal's Unique Identifier: 201159. Scientific disciplines assigned: Physical Culture Sciences (Field of Medical sciences and health sciences); Health Sciences (Field of Medical Sciences and Health Sciences).

Punkty Ministerialne z 2019 - aktualny rok 40 punktów. Załącznik do komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 1 grudnia 2021 r. Lp. 32343. Posiada Unikatowy Identyfikator Czasopisma: 201159.
Przypisane dyscypliny naukowe:Nauki o kulturze fizycznej (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu); Nauki o zdrowiu (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu).

© The Authors 2021;
This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Nicolaus Copernicus University in Torun, Poland
Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author (s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non commercial license Share alike.
(http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Received: 25.11.2021. Revised: 30.11.2021. Accepted: 14.12.2021.

Nicolaus Copernicus University in Toruń, Poland
Faculty of Earth Sciences and Spatial Management

Dolomatov S.I., Kazakova V.V., Zukow W.

Toolkit

PROTEOMICS

Toruń 2021

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska
Wydział Nauk o Ziemi i Gospodarki Przestrzennej

Доломатов С.И., Казакова В.В., Жуков В.А.

Методическое пособие

ПРОТЕОМИКА

Toruń 2021

Streszczenie

Proteomika

Dolomatov S.I., Kazakova V.V., Zukow W.

Słowa kluczowe: Proteomika

Proteomika to dział biologii molekularnej zajmujący się identyfikacją i analizą ilościową białek w obiektach żywych, a także analizą funkcji białek i ich interakcji.

Proteomika jest badana przez białka, które ulegają ekspresji w danej komórce, tkance lub organizmie w określonym czasie (w określonych warunkach).

Wiadomo, że informacja o strukturze pierwszorzędowej białka (sekwencji reszt aminokwasowych w białku) zawarta jest w genie strukturalnym w postaci sekwencji kodonów (kodu genetycznego). Z drugiej strony mniej niż 10% genów jest funkcjonalnie aktywnych (wyrażanych) w komórkach somatycznych naszego ciała. Ponadto obserwuje się wyraźną tkankowo-specyficzną ekspresję genów. To z kolei prowadzi do osobliwości składu jakościowego syntetyzowanych białek w różnych tkankach. Nie mniej ważny jest fakt, że całkowita ilość białek syntetyzowanych przez nasze tkanki jest znacznie większa niż całkowita liczba genów strukturalnych zawierających informacje o ich pierwotnej budowie. Zjawisko to tłumaczy się aktywnością takiego mechanizmu, jak alternatywny splicing i szeroka gama szlaków posttranslacyjnego przetwarzania peptydów (kowalencyjna modyfikacja polipeptydu syntetyzowanego na rybosomie) w zdrowiu i chorobie. Tym samym nawet krótki przegląd treści semantycznej terminu „proteomika" wskazuje na niezwykle złożony układ cząsteczek białek w naszym organizmie, który odgrywa podstawową rolę w utrzymaniu homeostazy i bierze udział w tworzeniu odpowiedzi adaptacyjnych w odpowiedzi na niekorzystne zmiany w środowisko wewnętrzne i zewnętrzne.

Z punktu widzenia nauk medycznych, badanie składu białkowego tkanek i płynów biologicznych, a także badanie charakteru interakcji cząsteczek białek, jest bardzo interesujące w związku z rozwojem metod diagnostycznych i farmakologicznych. terapia wielu groźnych chorób człowieka. W związku z tym aktywnie rozwijano wysoce skuteczne metody analizy białek w próbkach biologicznych, takie jak dwuwymiarowa elektroforeza żelowa, spektrometria mas i metoda otrzymywania przeciwciał monoklonalnych.

Jest oczywiste, że pojęcia proteomiki i genomiki (całości materiału dziedzicznego organizmu) są ze sobą ściśle powiązane. Tymczasem rozszyfrowanie złożonej struktury pierwotnej i organizacji przestrzennej kwasów nukleinowych i białek jest niemożliwe bez użycia metod modelowania matematycznego, specyficznego oprogramowania i potężnej technologii obliczeniowej. W szczególności bez użycia specjalnych algorytmów analitycznych i oprogramowania niemożliwe jest przeprowadzenie sekwencjonowania kwasów nukleinowych i białek. Metoda sekwencjonowania pozwala na ustalenie jedynie podstawowej struktury biopolimerów - sekwencji nukleotydów w kwasach nukleinowych i sekwencji aminokwasów w białku. W konsekwencji odtworzenie przestrzennej organizacji natywnej cząsteczki biopolimeru, jej wizualizacja, przechowywanie w specjalistycznych bazach danych oraz identyfikacja przez inne laboratoria w kolejnych badaniach również wymaga zastosowania wyrafinowanej technologii komputerowej. Zastosowanie programów komputerowych umożliwia szerokie zastosowanie metody spektrometrii mas składu białkowego komórek i płynu pozakomórkowego.

Abstract

Proteomics

Dolomatov S.I., Kazakova V.V., Zukow W.

Key words: Proteomics

Proteomics is a branch of molecular biology that deals with the identification and quantification of proteins in living objects, as well as the analysis of protein functions and their interactions.

Proteomics is studied by proteins that are expressed in a given cell, tissue or organism over a period of time (under certain conditions).

It is known that information about the primary structure of a protein (the sequence of amino acid residues in a protein) is contained in a structural gene in the form of a codon sequence (genetic code). On the other hand, less than 10% of genes are functionally active (expressed) in the somatic cells of our body. Moreover, a distinct tissue-specific expression of genes is observed. This, in turn, leads to the peculiarities of the qualitative composition of the synthesized proteins in various tissues. No less important is the fact that the total amount of proteins synthesized by our tissues is much greater than the total number of structural genes containing information about their original structure. This phenomenon is explained by the activity of such mechanisms as alternative splicing and a wide variety of post-translational peptide processing pathways (covalent modification of a polypeptide synthesized on the ribosome) in health and disease. Thus, even a brief review of the semantic content of the term "proteomics" indicates an extremely complex system of protein molecules in our body, which plays a fundamental role in maintaining homeostasis and is involved in the formation of adaptive responses in response to adverse changes in the internal and external environment.

From the point of view of medical science, the study of the protein composition of tissues and biological fluids, as well as the study of the nature of the interaction of protein molecules, is of great interest in connection with the development of diagnostic and pharmacological methods. therapy of many dangerous human diseases. Therefore, highly effective methods of protein analysis in biological samples such as two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and the method of obtaining monoclonal antibodies have been actively developed.

It is obvious that the concepts of proteomics and genomics (the entire hereditary material of an organism) are closely related. Meanwhile, deciphering the complex primary structure and spatial organization of nucleic acids and proteins is impossible without the use of mathematical modeling methods, specific software and powerful computational technology. In particular, it is impossible to perform nucleic acid and protein sequencing without the use of special analytical algorithms and software. The sequencing method allows to determine only the basic structure of biopolymers - the sequence of nucleotides in nucleic acids and the sequence of amino acids in proteins. As a consequence, the reconstruction of the spatial organization of the native biopolymer molecule, its visualization, storage in specialized databases and identification by other laboratories in subsequent research also requires the use of sophisticated computer technology. The use of computer programs enables a wide application of the method of mass spectrometry of the protein composition of cells and extracellular fluid.

Содержание

Введение 7

1. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ 10

2. АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ 16

3. ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЙ ПРОЦЕССИНГ 18

4. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВОГО СОСТАВА В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА 23

4.1. Масс-спектрометрия белков 23

4.2. Применение моноклональных антител для определения белков 25

4.3. Двумерный электрофорез белков 26

4.4. Вестерн-блот анализ белков 26

5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДОСТИЖЕНИЙ ПРОТЕОМИКИ В СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЕ 28

Список литературы 29

Введение

Протео́мика (*proteomics*) — раздел молекулярной биологии, посвящённый идентификации и количественному анализу белков живых объектов, а также анализу функции белков и их взаимодействия.
Объектом изучения протеомики являются белки, которые экспрессируются в данной клетке, ткани или организме в данный момент времени (в данных условиях).

Известно, что информация о первичной структуре белка (последовательности остатков аминокислот в белке) содержится в структурном гене в виде последовательности кодонов (генетический код). С другой стороны в соматических клетках нашего организма функционально активны (экспрессируются) менее 10% генов. Более того, наблюдается выраженная тканеспецифическая экспрессия генов. Что в свою очередь приводит к особенностям качественного состава синтезируемых белков в различных тканях. Не менее важен и тот факт, что совокупное количество белков, синтезируемых нашими тканями, значительно больше, чем общее количество структурных генов, содержащих информацию об их первичной структуре. Это явление объясняется деятельностью такого механизма, как альтернативный сплайсинг и широким разнообразием путей посттрансляционного процессинга пептидов (ковалентной модификации синтезированного на рибосоме полипептида) в норме и при патологии. Таким образом, даже краткий обзор смыслового содержания термина «протеомика» свидетельсвует о чрезвычайно сложной системе белковых молекул нашего организма, выполняющей базовую роль в поддержании гомеостаза и принимающей участие в формировании адаптивных реакций в ответ на неблагоприятные изменения внутренней и внешней среды.

С точки зрения медицинской науки исследования белкового состава тканей и биологических жидкостей, а также изучение характера взаимодействия белковых молекул представляет большой интерес в связи с разработкой методов диагностики и фармакологической терапии целого ряда опаснейших заболеваний человека. В связи этим активное развитие получили высоко эффективные методы анализа белков в биологических пробах, такие, как двумерный гельэлектрофорез, масс-спектрометрия и метод получения моноклональных антител.

Очевидно, что понятия протеомика и геномика (совокупность наследственного материала организма) тесно связаны между собой. Между тем, расшифровка сложной первичной структуры и пространственной организации нуклеиновых кислот и белков невозможна без использования

методов математического моделирования, специфического программного обеспечения и мощной вычислительной техники. В частности, без применения специальных алгоритмов анализа и программных продуктов невозможно проведение секвенирования нуклеиновых кислот и белков. Метод секвенирования позволяет установить только первичную структуру биополимеров - последовательность нуклеотидов в нуклеиновых кислотах и последовательность аминокислот в белке. Следовательно, реконструкция пространственной организации нативной молекулы биополимера, ее визуализация, хранение в специализированных базах данных и идентификация другими лабораториями при последующих исследованиях также требует применение сложной вычислительной техники. Использование компьютерных программ делает возможным широкое применение метода масс-спектрометрии белкового состава клеток и внеклеточной жидкости.

1. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ

Термином «экспрессия генов» мы объединяем группу фундаментальных биохимических процессов, обеспечивающих извлечение наследственной информации из молекулы ДНК в виде матричной (информационной) РНК с целью реализации извлеченной информации в форме конкретной эффекторной молекулы белка, предназначенной для выполнения востребованной в настоящий момент функции. Сразу сделаем несколько замечаний. Во-первых, активация (экспрессия) генов и сам процесс биосинтеза белка в эукариотических и прокариотических клетках характеризуются целым рядом отличий (Таблица 1).

Таблица 1.

Отличия организации генома и экспрессии генов у прокариот и эукариот

Прокариоты	Эукариоты
ДНК кольцевидной формы, не соединена с белками, расположена в цитоплазме	ДНК линейная, соединяется с гистоновыми и негистоновыми белками, находится в ядре клетки
Нет интронов	Есть интроны
Мало генов (у кишечной палочки около 4000)	Много генов (у человека около 25 000)
Есть опероны	Нет оперонов Каждый ген окружен группой регуляторных генов
Оперонная регуляция активности генов	Сложная регуляция на уровне транскрипции, трансляции и посттрансляционных процессов

Во-вторых, ДНК эукариот, в отличии от ДНК прокариот, образует сложный надмолекулярный комплекс со специфическими белками — хроматин.

Принцип регуляции экспрессии генов в прокариотической клетке осуществляется благодаря системе **оперона.** В эукариотических клетках основными механизмами регуляции экспрессии генов являются

эпигенетические системы контроля ковалентной модификации хроматина и образования специфических микро-РНК. Рассмотрим эти процессы.

Под ковалентной модификацией хроматина следует понимать присоединение (с образованием ковалентной связи) карбокси-групп (COOH), остатков фосфорной кислоты и некоторых низкомолекулярных органических соединений (чаще всего метил-радикалов — CH3) к молекулам коровых (от слова **core** — ядро) гистоновых белков (H2A, H2B, H3 и H4 гистонов) или непосредственно к молекуле ДНК. Управляет этими процессами система ядерных ферментов-трансфераз, которая, в свою очередь, регулируется гормонами системного действия и цитокинами. Ковалентная модификация хроматина обратима. Например, устранение ранее присоединенных карбокси-групп осуществляют ядерные деацетилазы, соответственно метил-радикалы устраняют ферменты деметилазы и т.д.. Прямые и обратные процессы ковалентной модификации хроматина также характеризуются высокой пластичностью — обладают способностью достаточно быстро изменять свою направленность и интенсивность в зависимости от изменений условий среды. Смысл такой модификации заключается в том, что не меняя первичной структуры ДНК, сделать возможным или невозможным извлечение и реализацию наследственной информации, т. е. управлять экспрессией генов.

Нуклеопротеиновый комплекс — хроматин, с одной стороны, следует рассматривать в качестве достаточно надежного фактора защиты молекулы ДНК от действия различных нуклеаз — ферментов, способных привести к повреждению ДНК. С другой стороны, именно коровые гистоны непосредственно вовлечены в управление активностью генов и могут контролировать количественный и качественный состав белков в клетках и тканях. Почему именно гистоны? Вам уже известно, что течение митотического цикла соматической клетки закономерно меняет степень упаковки (конденсации) хроматина. Во время кариокинеза (точнее в метафазе) хроматин максимально плотно упакован (книга закрыта и недоступна для чтения). Доступ к наследственной информации в это время почти полностью заблокирован. Во время кариокинеза биосинтетические процессы, практически, останавливаются, но, это не представляет проблемы для клетки,. Все необходимые биополимеры и органические субстраты, востребованные на этом этапе митотического цикла были синтезированы в интерфазе.

Напротив, в интерфазе хроматин максимально распакован (деконденсирован — книга открыта, ее можно читать), в этом случае главной физической преградой, препятствующей извлечению наследственной информации (транскрипции), являются коровые гистоны нуклеосомы. Формирование нуклеосомы обусловлено электростатическим

взаимодействием ДНК и белков-гистонов за счет отрицательного заряда остатков фосфорной кислоты, расположенных на внешнем радиусе спирали ДНК и положительного заряда большого количества азот-содержащих групп в составе остатков аминокислот гистонов. Этот, достаточно прочный тип связи, делает невозможным доступ ДНК-зависимой РНК-полимеразы к промотору гена. Для того чтобы сделать этот доступ возможным необходимо каким-то образом разобщить компоненты нуклеосомы, нарушив связь между ДНК и коровыми гистонами.

Рисунок 1. Доступность наследственной информации в зависимости от ковалентной модификации (ацетилирование) коровых гистонов.
(Цитировано по Agnieszka Gadecka and Anna Bielak-Zmijewska
http://propionix.ru/zamedlenie-stareniya-rol-pitatelnyh-veshchestv-i-mikrobioty-v-modulyacii-epigenoma)

В левой части Рисунка 1 мы видим нити молекулы ДНК (синего цвета), плотно упакованные в нуклеосомы. В правой части рисунка гистоны одной из нуклеосом подверглись ковалентной модификации. В результате связь между коровыми гистонами и ДНК была нарушена. Поэтому в генах, освободившихся от гистонов участков ДНК, активно протекает транскрипция. В большинстве случаев к аналогичному результату (но, не всегда) приводит и метилирование коровых гистонов, а также присоединение к белкам гистонам других эпигенетических меток (рисунок 2).

Рисунок 2. Схема точек расположения метильных, ацильных и других химических групп на коровых гистонах.
(Цитировано по
https://ru.m.wikipedia.org/wiki/Файл:Histone_modifications.png)

Когда мы говорим о ковалентной модификации хроматина, мы понимаем не только образование ковалентных связей различных химических групп с молекулами коровых гистонов, но и с молекулой ДНК. Примером такого взаимодействия является присоединение метил-радикалов к молекуле ДНК, регулируемое ферментами ДНК-метилтрансферазами. Еще раз подчеркнем, что такая ковалентная модификация молекулы ДНК, с одной стороны, не приводит к изменению нуклеотидной последовательности. С другой стороны, может оказывать влияние на экспрессию гена. Такой эффект возможен, поскольку изменению подвергается специфический участок структурного гена — промотор, отвечающий за взаимодействие с ДНК-зависимой РНК-полимеразой и инициацию транскрипции. Следовательно, если промотор подвергся метилированию, то его способность присоединять РНК-полимеразу заблокирована. Напротив, освобождение промотора от метил-радикалов, делает старт транскрипции возможным.

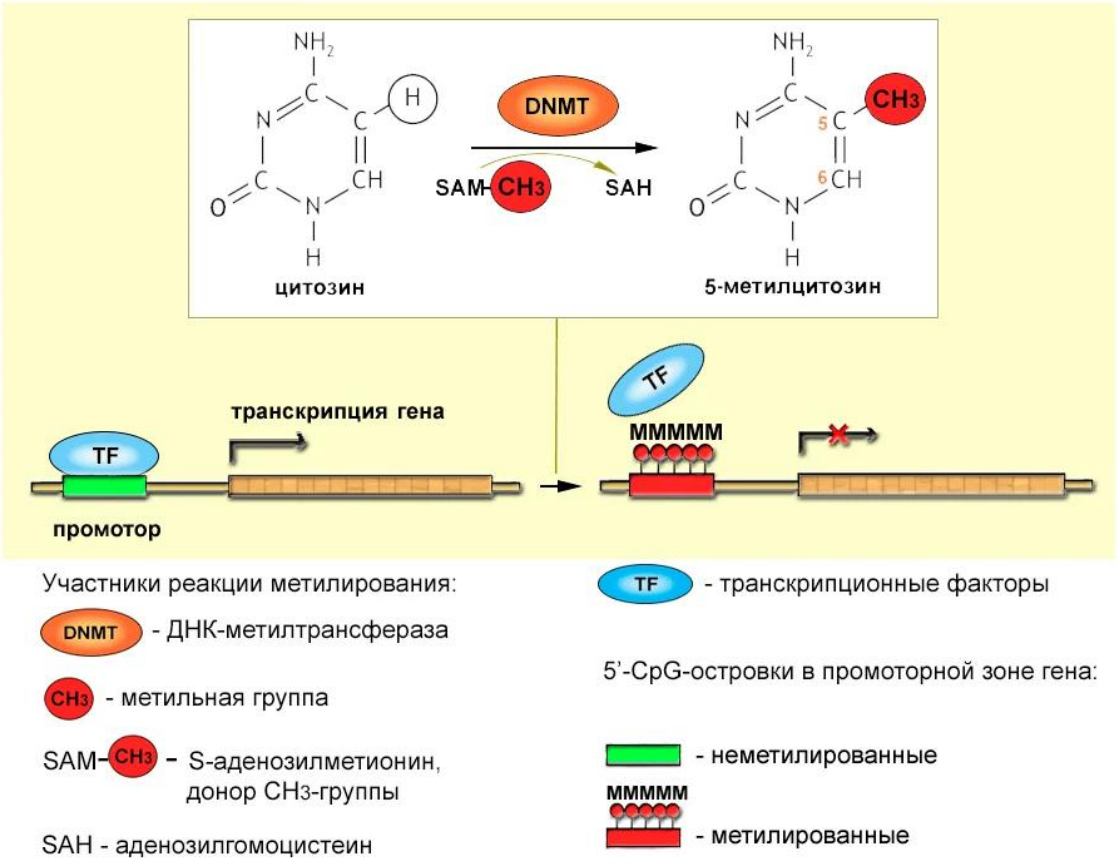

Рисунок 3. Влияние метилирования промотора на процессы транскрипции. (Цитировано по Ольга Волкова https://biomolecula.ru/articles/epigenetika-psoriaza-molekuliarnye-otmetiny-sudby)

На рисунке 3 (правая его часть) изображен прямоугольник красного цвета — это промотор, транскрипция которого заблокирована присоединением метильных групп (кружки красного цвета). В левой части рисунка изображен промотор (зеленый прямоугольник), свободный от метильных групп, следовательно, доступный для РНК-полимеразы.

Вместе с тем, роль эпигенетических механизмов в регуляции экспрессии генов не ограничивается ковалентной модификацией хроматина. Еще одним важным механизмом данной группы регуляторных процессов является синтез микро-РНК. Данный тип РНК не содержит информацию о первичной структуре белка (как матричная или информационная РНК), не принимает участие в процессах транспорта аминокислот (как т-РНК), не вовлечена в механизмы трансляции (как фрагменты р-РНК).

По своей природе микро-РНК — короткие нуклеотидные последовательности, состоящие из, примерно, 20 нуклеотидов. Их задача сводиться к тому, что бы образовывать комплементарные связи с матричной цепью ДНК (ингибируя экспрессию генов на уровне транскрипции). Либо комплементарно связываться с м-РНК, ингибируя экспрессию генов на уровне трансляции. Между тем, влияние микро-РНК на экспрессию генов чаще всего рассматривают в связи с ее способностью связываться с м-РНК. Т.е., контролировать экспрессию генов на уровне трансляции. Источником микро-РНК, например, могут являться участки **интронов**. Вместе с тем, образование микро-РНК (часто нескольких молекул микро-РНК) может быть результатом направленной транскрипции структурного гена.

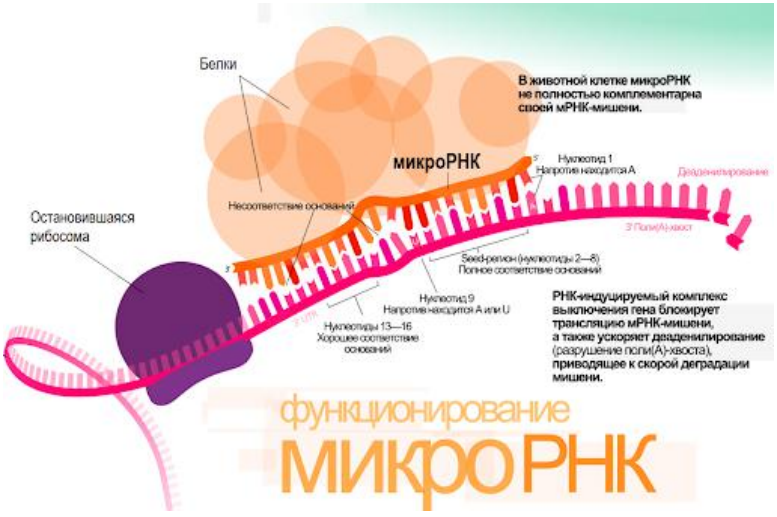

Рисунок 4. Участие микро-РНК в регуляции экспрессии генов на уровне трансляции.
(Цитировано по Kefan Bi, Xujun Zhang, Wenbiao Chen and Hongyan Diao
http://propionix.ru/mikrornk-mikrobiom-kishechnika-i-immunitet)

На рисунке 4 схематически изображен процесс ингибирования процесса биосинтеза белка молекулой микро-РНК на уровне трансляции.

При этом, с одной стороны, микро-РНК, прикрепившаяся к м-РНК, блокирует ход трансляции. С другой стороны, комплекс микро-РНК и м-РНК ускоряет процесс деградации (разрушения) м-РНК.

2. АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ

Известно, что сплайсинг — один из этапов посттранскрипционного процессинга первичного транскрипта или про-РНК (наряду с кэпированием и присоединением поли-А последовательности), основанный на вырезании интронов (интроны — группы нуклеотидов про-мРНК, не принимающие участия в кодировании данного белка) и сшивании экзонов (кодирующих участков). Напомним, что про-РНК будущих р-РНК и т-РНК также проходят этап посттранскрипционного процессинга. Вместе с тем, подчеркнем, что в данном случае речь идет о матричной РНК, содержащей информацию о первичной структуре синтезируемого белка.

Наряду с этим, существует такая форма посттранскрипционного процессинга про-мРНК, как «альтернативный сплайсинг. Этот механизм противоречит основной догме молекулярной биологии «один ген — один белок». В этом случае, альтернативный сплайсинг позволяет на базе наследственной информации одного структурного гена синтезировать разные белки.

Важно подчеркнуть, что механизм альтернативного сплайсинга — одна из причин (наряду с посттрансляционным процессингом пептидов), почему в нашем организме количество белков существенно превышает число структурных генов, содержащих информацию о первичной структуре белка.

Таким образом, альтернативный сплайсинг — один из основных механизмов, отвечающих за образование разных белков на базе одного структурного гена. Эти белки отличаются не только свой структурой, но и выполняемой функцией.

Рисунок 5. Пример альтернативного сплайсинга на базе гена, кодирующего белковый гормон кальциотонин
(Цитировано по Абилдахан Е.А.
https://studopedia.net/7_60496_modifikatsiya-gistonovih-belkov.html)

Одним из примеров альтернативного сплайсинга (рисунок 5) является процесс биосинтеза белков на матрице гена, детерминирующего синтез гормона кальциотонина в секретирующем эпителии паращитовидной железы. В нейронах головного мозга на базе этого же гена за счет альтернативного сплайсинга синтезируется нейропептид, регулирующий восприятие запахов. В качестве еще одного примера альтернативного сплайсинга можно привести реализацию наследственной информации геном АПОВ — отвечающего за кодирование первичной структуры белка Аполипопротеина В. Данный белок выполняет важную функцию в процессах транспорта жирных кислот и холестерола во внутрисосудистой жидкости нашего организма. Дело в том, что данный белок может синтезироваться паренхимой печени (Апо В-100) и эпителием кишечника (Апо В-48). Отличие обозначено в самом названии аполипопротеинов и заключается в том, что в печени 100% (Апо В-100) экзонов реализуются в окончательный белок. В эпителии кишечника только часть экзонов - 48% (Апо В-48) реализуются в эффекторную молекулу белка, остальные экзоны воспринимаются сплайсосомой, как интроны и вырезаются. Альтернативный сплайсинг выполняет важную функцию в управлении адаптивными реакциями организма. По мере созревания антител в плазматических клетках, данные белки утрачивают якорный участок молекулы, укрепляющий их на поверхности плазматической мембраны и переходят в растворимое состояние. Это становится возможным потому, что экзоны, кодирующие аминокислотные последовательности якорного участка антитела, превращаются в интроны и удаляются. Не менее важным аспектом является роль альтернативного сплайсинга при патологии. В том числе, используя альтернативный сплайсинг малигнизированные клетки приобретают способность синтезировать атипичные протеины.

3. ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЙ ПРОЦЕССИНГ

Механизмом трансляции (синтезом пептидной цепи на рибосоме) процессы формирования белка не завершаются. Дело в том, что в ходе трансляции воссоздается только первичная структура белка — последовательность аминокислотных остатков молекулы. Такую пептидную молекулу клетка использовать не может. Чтобы вновь синтезированный пептид смог выполнять свою функцию ему необходимо придать вторичную и третичную, если необходимо, то и четвертичную структуру. Именно этот круг задач и решается в рамках посттрансляционного процессинга. Фактически, именно на этом этапе завершается процесс экспрессии генов.

Вместе с тем, наряду с альтернативным сплайсингом, посттрансляционный процессинг белков способствует появлению широчайшего разнообразия форм белков в нашем организме, на порядки превышающее количество структурных генов, кодирующих первичную структуру белка. Это позволяет на базе одной полипептидной цепи, синтезированной в ходе трансляции, создать большое количество разнообразных биополимеров, отвечающих за различные функции. Посттрансляционная ковалентная модификация протеинов может начинаться еще в просвете канальцев эндоплазматического ретикулума, активно протекать в комплексе Гольджи и может продолжаться после выведения белка во внеклеточную жидкость.

Как правило, первоначально белок проходит этап «укладки» (фолдинга), который проходит в просвете канальцев эндоплазматической сети. В результате фолдинга пептидная молекула приобретает специфическую пространственную организацию, соответствующую дальнейшим функциям конечного продукта. В дальнейшем подавляющее большинство белков претерпевает ковалентную трансформацию их первичной структуры за счет точечного протеолиза (отщепления фрагментов пептидной цепи) или ковалентного присоединения различных химических групп или биополимеров. Примером такого ковалентного присоединения может служить система АВ0. В локусе (9q34.2) 9-ой пары хромосом содержится информация о ферментах гликозилтрансферазах А (ген I^A - изоферменты А1 и А2) и В (ген I^B). Гликозилтрансферазы А и В отвечают за формирование антигенов А и В благодаря гликозилированию белков (фосфолипидов) плазматической мембраны. Ген I^0 не содержит информации о функционально активном ферменте, поэтому не принимает участия в образовании антигенов. В качестве еще одного примера роли посттрансляционного процессинга можно привести пример ковалентной перестройки белков-гистонов. Данный механизм на базе 4-х коровых гистоновых белков позволяет сформировать более ста разнообразных

модификаций белковых молекул (рисунок 6). При этом, необходимо подчеркнуть, что характер ковалентной модификации коровых гистонов имеет исключительно важное значение для регуляции экспрессии генов.

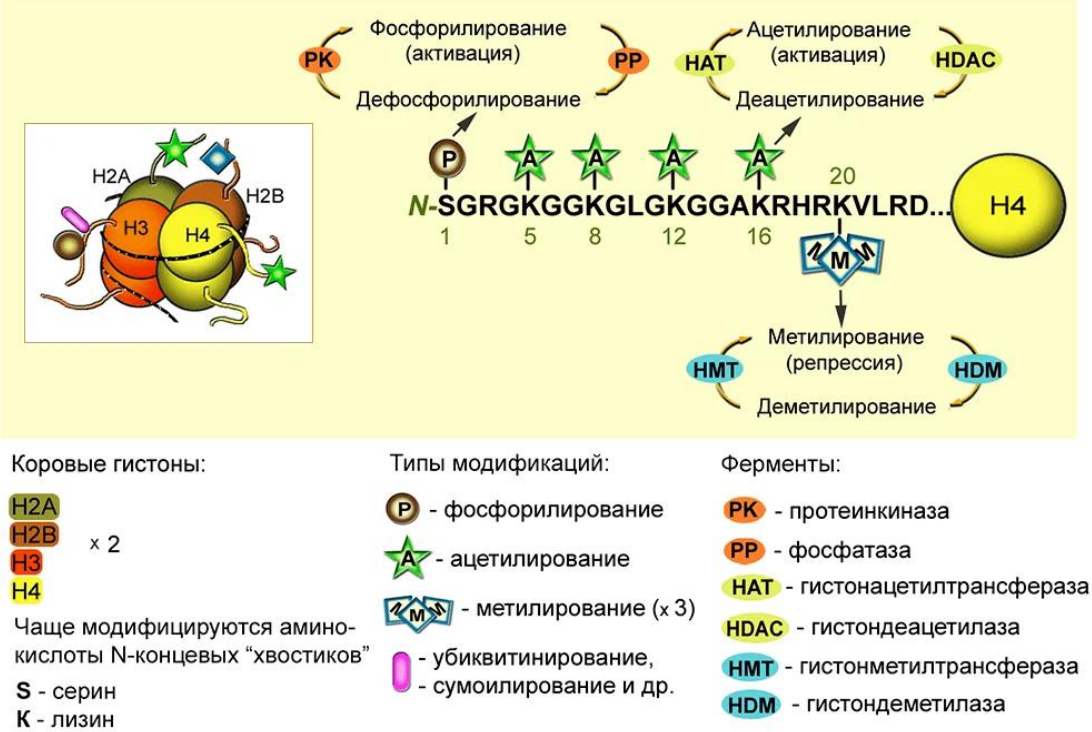

Рисунок 6. На рисунке указаны возможные химические группы, присоединяемые к коровым гистонам и ферменты, отвечающие за присоединение этих групп.

(Цитировано по Ольга Волкова
https://biomolecula.ru/articles/epigenetika-psoriaza-molekuliarnye-otmetiny-sudby)

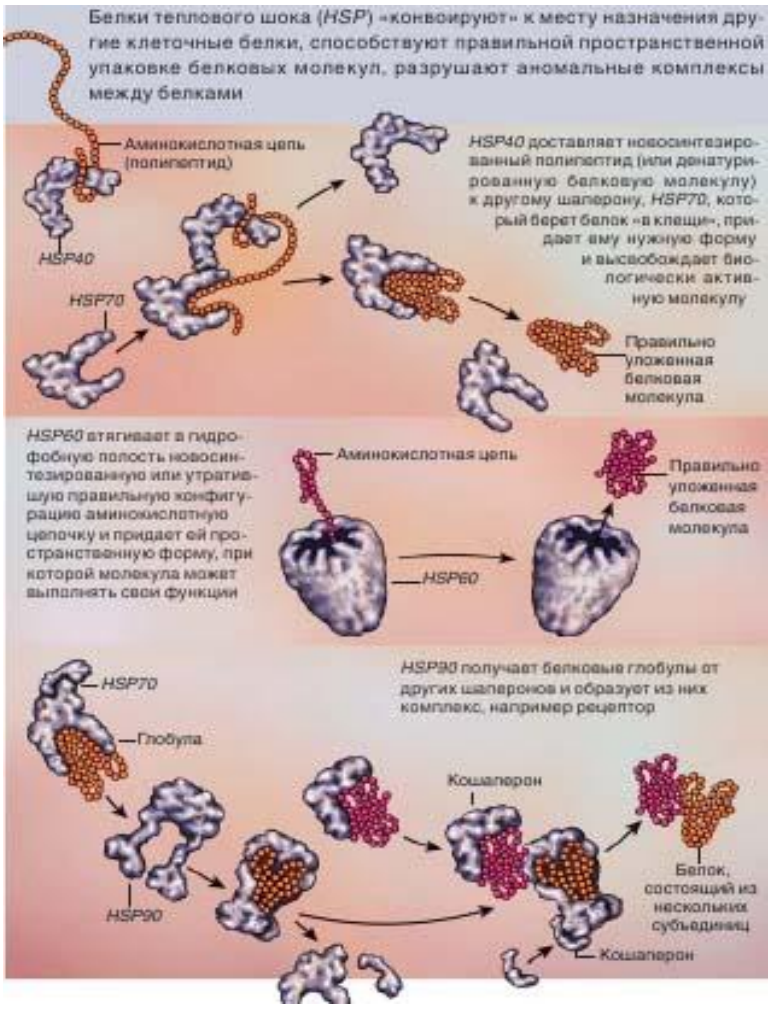

Рисунок 7. Роль шаперонов в процессах фолдинга вновь синтезированного пептида на примере шаперона — белка теплового шока.
(Цитировано по Прамод Шривастава
http://mglinets.narod.ru/slova6/chaperons.htm)

В частности, в результате сворачивания (укладки в пространстве) белок приобретает сложную трехмерную структуру, чему способствуют специализированные белки-шапероны (рисунок 7).

Еще одним важным механизмом постранслящионной модификации пептидов является ограниченный протеолиз. Т.е. расщепление одной или нескольких строго определенных пептидных связей в молекуле белка. Данный вид посттрансляционного процессинга также вносит существенный вклад в формирование разнообразия белковых молекул организма. Очевидно, что отщепление фрагментов пептидов или их разделение на отдельные молекулы существенно изменяет их первичную последовательность в сравнении с той, что была записана в структурном гене.

Очень часто этот вид процессинга используется при превращении функционально неактивного фермента (зимогена) или предшественника гормона (прогормона) в физиологически активную форму. Например, благодаря ограниченному протеолизу из одной гигантской общей молекулы проопиомеланокортина образуются молекулы эндорфина, адренокортикотропного гормона и меланоцитстимулирующих гормонов. В ряде случаев, ограниченный протеолиз может протекать в несколько этапов — при образовании активной формы гормона инсулина из неактивного предшественника препроинсулина. Этапы формирования физиологически активного инсулина из препроинсулина под влиянием ограниченного протеолиза изображены на рисунке 8.

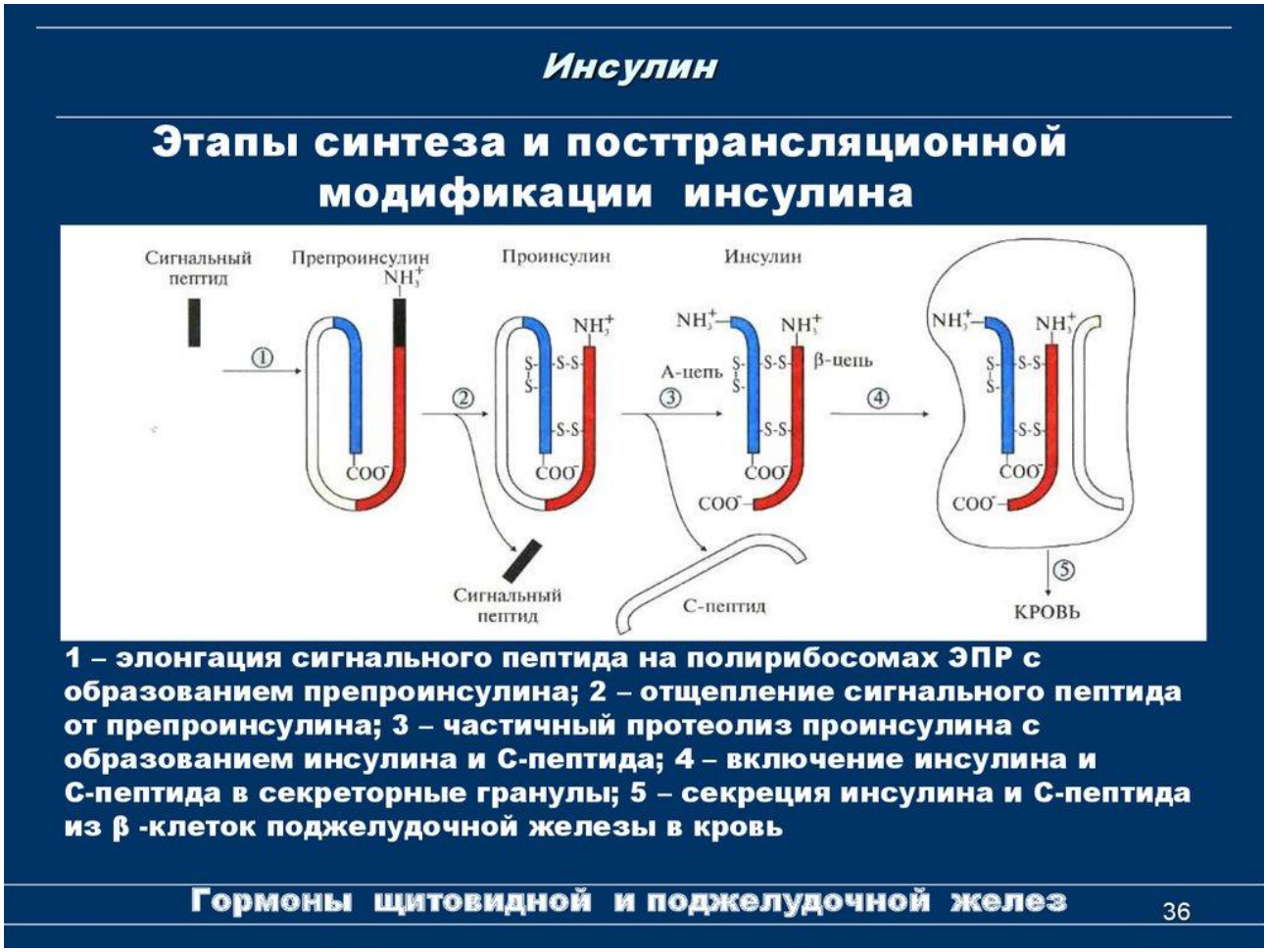

Рисунок 8. Этапы формирования физиологически активного инсулина. (Цитировано по даны ресурса https://thepresentation.ru/biologiya/gormony-shchitovidnoy-i-podzheludochnoy-zhelez-lektsiya-13)

Как уже отмечалось, присоединение небелковой группы к молекуле белка также часто наблюдается в ходе посттрансляционной модификации полипептидов. Такой способ модификации основан на присоединении целого ряда химических групп к молекуле белка и включает в себя: гликозилирование (ковалентное присоединение цепей различных

углеводов), фосфорилирование (ковалентное присоединение остатка фосфорной кислоты), метилирование (присоединение метильной группы), йодирование (присоединение атомов йода) и т. д. Например, присоединение углеводов к белковой молекуле (гликопротеины) оказывает влияние на пространственную структуру молекулы, ее антигенные свойства и может оказывать влияние на продолжительность существования молекулы в организме человека (скорость полувыведения). К группе гликопротенов относятся белки внеклеточного матрикса, большинство белков плазматической мембраны и плазмы крови, антитела, интерфероны и некоторые белковые гормоны.

4. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВОГО СОСТАВА В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

Таким образом, представленный выше краткий обзор путей биосинтеза и модификации белков, а также их роли в нашем организме в норме и при патологии непосредственно подводит к необходимости освещения вопроса о методах анализа различных белков в биологических средах. Тезис о том, что данная группа методов инструментального анализа белков имеет чрезвычайно важное значение для диагностики и фундаментальных исследований не требует дополнительной аргументации. На разных этапах развития медицинской науки специалистов интересовал вопрос изучения белкового состава организма. Для решения этой задачи применялись различные методы. Тем не менее, по нашему мнению, особое внимание следует уделить высоко специфическим современным методам исследования белков, обладающих высокой селективностью (избирательностью) и активно внедряемым в современную медицинскую и исследовательскую практику.

В данном разделе мы рассмотрим базовые принципы таких методов исследования белков, как масс-спектрометрия, двух-мерный электрофорез белков и методики использования моноклональных антител.

4.1. Масс-спектрометрия белков

Данная группа методов за более, чем пятидесятилетний период своего существования прошла довольно сложный путь становления. В настоящее время основным техническим решением метода идентификации белков является метод Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (сокращенно — МАЛДИ, Рисунок 9).

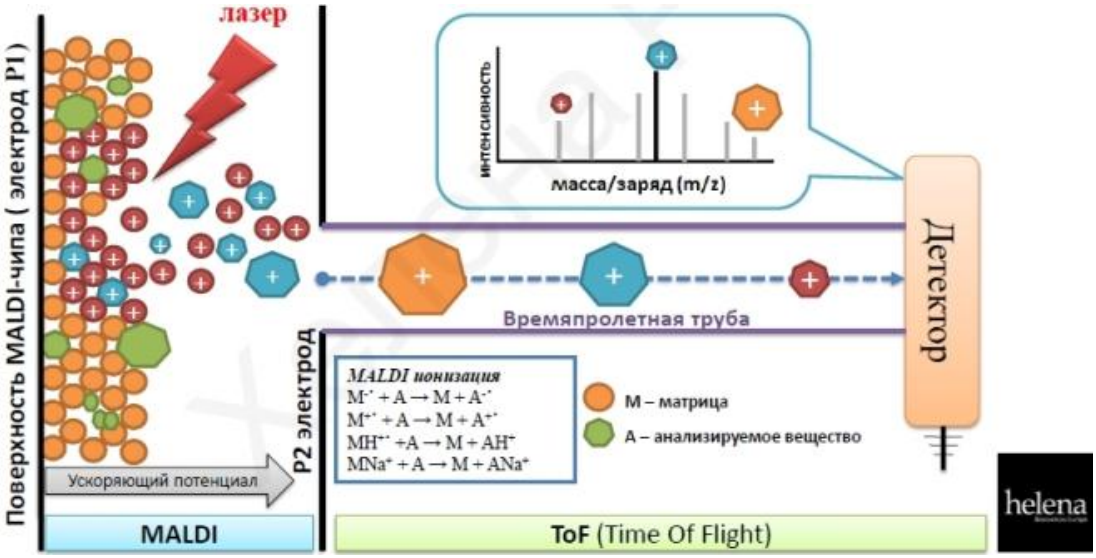

Рисунок 9. Принципиальная схема метода МАЛДИ.
(Цитировано по данным ресурса https://myslide.ru/presentation/skachat-sovremennye-metody-diagnostiki-v-klinicheskoj-mikrobiologii)

Научное обоснование данного технического решения было предложено в 1987 году немецкими учеными M. Karas и F. Hillenkamp. Практическое воплощение данной идеи, в виде технической разработки принципа МАЛДИ, осуществил Коити Танака - инженер японского приборостроительного концерна Shimadzu, получивший за свою работу Нобелевскую премию в 2002 году. Данный факт красноречиво свидетельствует о значении данного метода для современной науки и медицины. Подчеркнем, что современные измерительные установки позволяют определять количества белка на уровне 10^{-15} Моль.

Принцип работы данного класса приборов основан на том, что исследуемая проба помещается в среде, заполненную инертным газом, на специальную подложку и подвергается короткому (наносекунды) импульсу высокоэнергетического лазерного излучения (10^6— 10^7 Вт/см²) . Под влиянием энергии лазера и экзотермических реакций, протекающих в данной среде, молекулы белка подвергаются ионизации (приобретают электрический заряд), перемещаются в направлении фотолюминисцентного слоя фото-электронного умножителя (ФЭУ) и детектируются по вспышкам на люминисцентном экране ФЭУ. Скорость прохождения молекулы белка расстояния от подложки до люминсцентного экрана зависит от массы и заряда молекулы, что позволяет с высокой эффективностью определять очень широкий спектр белков и других биополимеров, например, углеводы и олигонуклеотиды. Роль матрицы, расположенной на подложке состоит в том, что она защищает

исследуемую пробу от возможного деструктивного воздействия лазерного импульса, в тоже время, способствуя ионизации молекул биологической пробы. Напомним, что белки — нелетучие органические соединения. Поэтому, для эффективной детекции (определения) высокомолекулярных белков предварительно проводят их точечный протеолиз, например, обрабатывая их трипсином. Образовавшийся в результате протеолиза набор пептидов определяют методом масс-спектрометрии. Поскольку этот набор пептидов специфичен для данного белка это позволяет достаточно надежно идентифицировать белок.

Следует отметить, что данный метод сразу нашел применение в практической медицине. Уже в 2009 году начался серийный выпуск данной установки, предназначенной для быстрой и надежной идентификации патогенных микроорганизмов по набору видоспецифических протеинов.

4.2. Применение моноклональных антител для определения белков

Моноклональные антитела получают при иммунизации клеток-клонов ранее существовавшей материнской плазматической клетки каким-то конкретным антигеном. Моноклональные антитела идентичны по своим структуре, составу и биологической активности.

В частности, современные иммуноцитохимические методы позволяют идентифицировать онкологические маркеры белковой природы в клетках человека, определяя их уровень экспрессии и локализацию. Данный метод позволяет проводить диагностику вирусных заболеваний, основанную на выявление вирусных белков моноклональными антителами. В целом, в современной медицине достаточно широко используются иммуноцитохимические методы определения белков-маркеров различных заболеваний, связанных с нарушением сердечно-сосудистой системы, аутоиммунных заболеваний, болезней почек, сахарного диабета, патологического течения беременности и т.д.

Наряду с этим, моноклональные антитела широко используются такими высоко точными и чувствительными методами анализа белков в плазме крови человека, как радиоиммунный анализ (РИА) и иммуноферментный анализ (ИФА) для определения белковых гормонов, специфических антител при аутоиммунных заболеваниях, маркеров течения беременности, онкомаркеров и т.д. Однако, если иммуноцитохимичесий метод позволяет определять качественные и полуколичественные характеристики присутствия белка в исследуемых объектах (что тоже безусловно важно), то РИА и ИФА позволяют получать очень точные количественные параметры присутствия исследуемых

белков в среде. Иммуноцитохимичесий метод, наряду с ИФА и РИА широко используются в современной диагностической практике.

4.3. Двумерный электрофорез белков

Метод электрофореза белков (и нуклеиновых кислот) основан на разделении белковых молекул в буферном растворе под действием постоянного электрического поля. Разделение молекул происходит в соответствии с их массой и электрическим зарядом. Необходимость в двумерном электрофорезе возникает тогда, когда необходимо разделить и идентифицировать смесь большого количества белков (более 100 белков). Такую задачу, практически, невозможно решить с помощью обычного электрофореза. Поэтому электрофорез сложной смеси белков проводят в два этапа. В первом направлении электрофорез проводят обычным способом, а затем полученную электрофореграмму используют без фиксации и окрашивания в качестве стартовой зоны для электрофореза во втором направлении. Это делают потому, что полное разделение сложной смеси белков далеко не всегда удается осуществить в ходе обычного электрофореза. Всегда достаточно высока вероятность того, что в данной системе электрофореза различные белки мигрируют в одной зоне либо в силу близости их размеров, либо ввиду совпадения значений их электрофоретических подвижностей при выбранном значении pH. Поэтому в сложных случаях каждую полосу после первого электрофоретического фракционирования смеси белков следует проверить на гомогенность, используя ее как исходный препарат для электрофореза в других условиях. Это можно сделать одновременно для всех полос первого разделения, или, как его часто называют, «разделения в первом направлении». Для этого трубку или полоску, вырезанную по всей длине трека из пластины первого направления, накладывают на стартовую зону пластины «второго направления». Контакт между двумя гелями обеспечивают, заливая место их соприкосновения стартовым буфером. В результате на пластине второго направления после прокрашивания выявляется картина распределенных по всей поверхности пятен, напоминающая «фингерпринт» в двумерной тонкослойной хроматографии. Число пятен, которое удается различить на одной пластине, в некоторых случаях приближается к двум тысячам.

4.4. Вестерн-блот анализ белков

Данный метод включает в себя комбинацию двух уже известных методов — последовательное применение обычного электрофореза и использование моноклональных антител к исследуемому белку. Первоначально исследуемую пробу разделяют на отдельные белковые

фракции в полиакриламидном геле. Затем полоску геля с разделенными белками переносят на нитроцеллюлозную мембрану с нанесенными антителами к исследуемому белку. Антитела связаны с репортерным ферментом (пероксидаза, щелочная фосфатаза), с люминисцентной меткой или изотопом. После удаления с поверхности мембраны компонентов, не участвующих в специфическом взаимодействии с белком количество исследуемого белка определяется спектрофотометрическим, люминисцентным или радиометрическим методами.

5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДОСТИЖЕНИЙ ПРОТЕОМИКИ В СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЕ

Прежде всего, необходимо отметить, что в мире ведется достаточно интенсивная работа по расшифровке протеома человека с целью составления точной карты белков различных тканей и отдельных популяций клеток, а также соотнесение обнаруженных белков к кодирующим их генам (Kim M.-S, Pinto S.M., Getnet D. et al., 2014). В рамках указанных исследований используются наиболее передовые технологии, в частности в определении белков широко применяется масс-спектрометрический метод. При этом, уделяется внимание не только изучению белкового состава тканей, но и характеру взаимодействия белков, а также специфике посттрансляционного процессинга белков в норме и при патологии (Ebhardt H.A. et al., 2015). Вместе с тем, в литературе высказываются мнения о том, что метод идентификации белков на основе масс-спектрометрии белков следует как можно скорее ввести в широкую практику клинической диагностики (Cifani P., Kentsis A., 2017). По мнению ряда экспертов, необходимо в ближайшее время провести сравнительный анализ содержания целого ряда белков в различных биологических жидкостях человека практически здоровых испытуемых и людей с конкретными нозологиями (Meyer J.G., Schilling B., 2017). Авторы цитируемой публикации полагают, что особое внимание необходимо уделить выявлению маркерных белков, свидетельствующих о той или иной патологии.

Список литературы

Kim M.-S, Pinto S.M., Getnet D. et al. A draft map of the human proteome//*Nature.*-2014.-T.509,№7502.-C.575–581. doi: 10.1038/nature13302

Ebhardt H.A., Root A., Sander C., Aebersold R. Applications of targeted proteomics in systems biology and translational medicine//Proteomics 2015.-T.15.-C.3193–3208. doi: 10.1002/pmic.201500004

Cifani P., Kentsis A. Towards comprehensive and quantitative proteomics for diagnosis and therapy of human disease//Proteomics.-2017.T.17,№1-2. doi: 10.1002/pmic.201600079

Meyer J.G., Schilling B. Clinical applications of quantitative proteomics using targeted and untargeted data-independent acquisition techniques//Expert Rev Proteomics.-2017.-T.14,№5.-C.419–429. doi: 10.1080/14789450.2017.1322904

http://propionix.ru/zamedlenie-stareniya-rol-pitatelnyh-veshchestv-i-mikrobioty-v-modulyacii-epigenoma

https://ru.m.wikipedia.org/wiki/Файл:Histone_modifications.png

https://biomolecula.ru/articles/epigenetika-psoriaza-molekuliarnye-otmetiny-sudby

http://propionix.ru/mikrornk-mikrobiom-kishechnika-i-immunitet

https://studopedia.net/7_60496_modifikatsiya-gistonovih-belkov.html

https://biomolecula.ru/articles/epigenetika-psoriaza-molekuliarnye-otmetiny-sudby

http://mglinets.narod.ru/slova6/chaperons.htm

https://thepresentation.ru/biologiya/gormony-shchitovidnoy-i-podzheludochnoy-zhelez-lektsiya-13

https://myslide.ru/presentation/skachat-sovremennye-metody-diagnostiki-v-klinicheskoj-mikrobiologii