ВВЕДЕНИЕ

протеомика исследование фермент

В настоящее время происходит революция в представлениях об этиологии, патогенезе и терапии болезней человека, что связано с достижениями в области молекулярной биологии и генетики, молекулярной медицины и фармакологии [1, 6].

Достигнуты серьезные успехи в понимании структуры и функции ДНК, РНК, белков, репликации и функционировании генома, обратной транскрипции, модификации, репарации и рекомбинации ДНК, транскрипции и трансляции мРНК в клетках про- и эукариот. Многочисленные исследования на основе новых биоаналитических методов прояснили основные пути регуляции экспрессии генов. Подробно изучены технологии рекомбинантных ДНК. Мощное развитие в настоящее время получило изучение физико-химических основ развития наследственных и социально-значимых болезней человека (атеросклероз, онкопатологии, сахарный диабет, внутриклеточные инфекции, нейродегенеративные болезни и т.д.).

В постгеномную эру остро встает вопрос о практической реализации фундаментальных разработок в области молекулярной биологии, медицины и фармакологии. При этом отражением функционирования генома являются постгеномные события, связанные с синтезом многочисленных белков, исследованию которых сейчас уделяется особое внимание в рамках отдельного научного направления - протеомики. Развитие протеомных исследований невозможно без построения алгоритмов и методов анализа, создания базы данных, позволяющих выяснять механизм функционирования биологических текстов и разрабатывать целенаправленные фармакологические воздействия (биотрансформатика).

Связанные проблемы геномики и протеомики, фармакогеномики и биотрансформатики реализуются на основе уникальных методологических решений и технологических платформ.

В настоящее время на уровне академических центров, различных НИИ России, стран СНГ, Западной Европы, США и Канады развиваются и внедряются в клинику результаты работы научных технологических платформ для биомедицинских и фармацевтических исследований.

Цель практики - изучить основы протеомики и протеомного картирования

Задача практики - закрепление и углубление теоретических знаний, полученных в процессе обучения; освоить методы работы со специальной литературой; собрать конкретные материалы в соответствии с рекомендованными вопросами; оформить результаты, полученные в ходе прохождение практики.

1. ПОНЯТИЯ, ПРИНЦИПЫ И НАПРАВЛЕНИЯ ПРОТЕОМИКИ

Начало XXI века ознаменовано началом эры протеомики. Термин этот происходит от двух других хорошо известных в биохимии понятий: «PROTEins» и «genОМe» и впервые был использован в 1995 г. [7].

Конечно, геномика не исчезнет, она будет развиваться с той же самой, а может даже большей скоростью, но ясно, что центр постгеномных исследований будет перенесен в область инвентаризации и выяснения протеомной карты человека. На первый взгляд, задача кажется совершенно не решаемой. Если геномная карта человека одинакова, по сути дела, для всех клеток человека (это 23 хромосомы с одним и тем же набором генов - исключение составляют 14 половые клетки), то в случае протеомной карты человека говорить об общности ее совершенно бессмысленно: каждая клетка, каждая ткань, каждая биологическая жидкость должна иметь собственную протеомную карту. Несмотря на то, что в каждой клетке может быть около 100 000 функционирующих генов, многочисленные реакции модификации могут увеличить число белков в клетке до 10 - 20 миллионов [2].

В этой связи в настоящее время существует два определения протеомики: узкое, которое можно назвать структурной протеомикой, и более широкое, которое включает и структурную, и функциональную части протеомики. В узком смысле этого слова протеомикой является наука, занимающаяся инвентаризацией белков с помощью комбинированного использования методов: двумерного электрофореза (2D-электрофорез), масс-спектрометрического (МС) анализа молекулярной массы и последовательности разделенных электрофорезом белков биологического материала с последующим анализом полученных результатов методами биоинформатики. По сути дела, структурная протеомика - это комбинация 2D-электрофореза, масс-спектрометрии и биоинформатики. И если разрешающие возможности двумерного электрофореза известны давно, с первой работы O’Farrell в 1975 г., то возможности МС анализа очень быстро определять молекулярную массу и последовательность полипептидных цепей стали ясны только в самое последнее время. Развивались они настолько быстро, что сейчас некоторыми фирмами созданы уже полностью автоматизированные системы для определения молекулярной массы и последовательности белков, работающие на фентомолярном и атомомолярном уровнях концентрации [7, 8, 10]. С помощью комбинации этих методов можно создать протеомную карту любого биологического материала, которая представляет собой фенотипическое проявление генома клетки, ткани или даже целого органа. В более широком смысле термины протеомный анализ, или протеомика могут быть использованы не только для инвентаризации белков биологического объекта, но и для контроля обратимой посттрансляционной модификации (ПТМ) белков специфическими ферментами, как-то: фосфорилирование, гликозилирование, ацилирование, френилирование, сцльфирование и т.д. [1].

В настоящее время уже более 300 различных типов посттрансляционной модификации охарактеризовано с помощью протеомики [9].

Интенсивное развитие МС-анализа способствовало появлению за последние 5 - 7 лет целой группы направлений протеомных исследований (рис. 1), большая часть которых имеет биомедицинскую направленность, однако, фундаментальная основа на сегодняшний день, по-прежнему, сохраняется за структурной и функциональной протеомикой.

Политика большинства стран Евросоюза, России и стран СНГ в той или иной степени связана с естественным стремлением населения жить в соответствии с мировыми стандартами качества. Такие термины как «экологически чистый район» или «экологически чистый продукт», а также всевозможные слова с приставкой «евро-», прочно вошедшие в обиход, к сожалению, в большинстве случаев, не имеют фактического пополнения. Вместе с тем, желанные стандарты качества жизни, установленные во многих странах, являются результатом протекания сложных процессов, затрагивающих культурные, социальные и правовые аспекты развития этих государств.



Рисунок 1 - Современные направления протеомного анализа.

ПРОТЕОМНОЕ КАРТИРОВАНИЕ

«В мире не существует двух индивидуумов с абсолютно одинаковым метаболизмом. Индивидуальные различия активности ферментов в печени могут быть причиной различий в ответной реакции пациентов на лекарство" А Гаррод.

Важность этих слов, принадлежащих, сложно переоценить в свете последних достижений молекулярной медицины. Прочтение геномов ряда организмов, и прежде всего человека, ознаменовало начало эры постгеномных технологий. Существенное влияние они оказали на медицину, позволив систематически анализировать молекулярные механизмы зарождения и развития заболевания. Знание этих механизмов позволяет подойти к качественно новому пониманию вопросов, связанных с профилактикой, диагностикой и лечением заболеваний. Пожалуй, впервые за всю свою историю медицина получила шанс приблизиться к статусу точной науки, миновав описательную практику анализа патологических процессов, бытовавшую в течение столетий.

Протеомная карта заболевания - это понимание развития клинической картины заболевания в виде количественных и качественных нарушений на геномном, транскрипционном, трансляционном и посттрансялционном уровнях функционирования организма, т.е. на уровне нарушений в составе и взаимодействии генов в ДНК, РНК, белков, липидов, углеводов, а также на уровне образующихся в клетке и взаимодействующих между собой метаболитов.[3]

Важно подчеркнуть, что наличие подобных нарушений часто указывает лишь на вероятность развития патологии, следовательно можно, повлияв на факторы внешней среды, снизить вероятность развития заболевания, если провести соответствующие индивидуальные профилактические мероприятия.

Большинство заболеваний, таких как псориаз, шизофрения, диабет, обусловлены комбинацией малоэффективных генных вариантов, другими словами, обусловлены не единичным нарушениями, а их набором, локализованным в различных генах. При наличии четкой взаимосвязи между дефектом одного гена и развитием патологии можно говорить о ее наследственном характере. Однако на долю наследственных приходится лишь 2-5% всех заболеваний, остальные связаны с нарушением целого ансамбля генов, а значит, зависят от индивидуального профиля многих однонуклеотидных замен и/или нарушения экспрессии группы генов.

Протеомная диагностическая карта: включает SNP, ассоциированные с заболеваниями и SNP, ответственные за фармакокинетику и фармакодинамику лекарств, она формируется на основе знаний геномики, протеомики, липидомики, метаболомики, селломики, интерактомики и с применением современных методов полимеразной цепной реакции, хромато-масс-спектрометрии, современных видов микроскопии, микрофлюидных и нанотехнологических решений для аналитических работ.

Подобно тому, как сейчас гражданский паспорт служит документом, удостоверяющим личность, протеомная диагностическая карта, кроме идентификации личности, может предназначаться и для выбора индивидуумом соответствующего образа жизни. На его основе можно определять персонифицированное лечение, воплощая в жизнь золотой стандарт современной медицины: каждому больному - свое лекарство в нужное время и в нужной дозе.

Молекулярная (протеомная) диагностика является достоверным инструментом диагностики ранних стадий онкологических заболеваний и конкретно диагностики "молчащих раков", не проявляющих себя до тех пор, пока лечить его не станет поздно. Традиционные методики верификации рака подразумевают проведение биопсии, то есть забора микропорции ткани. Однако с точки зрения диагностики подход абсолютно неприемлем, поскольку трудно предположить человека, который в рамках плановой диспансеризации соглашается на манипуляции, по сложности и болезненности приближающиеся к хирургической операции. Значит, единственным наиболее доступным для диагностики биологическим образцом была и будет протеомное исследование крови.

В глобальном масштабе протеомика занимается инвентаризацией всех белков организма. Медицинский аспект проблемы - установить корреляцию между набором белков и началом или развитием болезни. Задача сходна с геномикой, где определяется зависимость между болезнью и геномом, но на порядок сложнее. Дело в том, что белков намного больше, чем генов. Число последних оценивается в 30-40 тыс., однако каждый ген может считываться во множестве (до 200) альтернативных вариантов, а значит, белков может быть значительно больше - до 6-8 млн. в одной клетке. Причем конкретный белок может быть экспрессирован как в виде единичных молекулярных копий, так и в огромном количестве - налицо широкий диапазон концентраций белков в клетке и биологических жидкостях. Можно возразить, что похожая ситуация складывается и при анализе ДНК, но в отличие от ДНК белки невозможно наработать в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР). А ведь именно ПЦР - основа всех методов работы с генетическим материалом, поскольку позволяет избирательно поднять концентрацию определенной молекулы ДНК до уровня, который может быть зарегистрирован приборами. Следовательно, методической основой протеомики является подход, при котором чувствительность приборов позволяет регистрировать отдельные молекулы. [5]

Существует международный проект "Протеом человека" (аналог проекта "Геном человека") который планирует конструирование протеомной карты всех белков человека. Первоочередные задачи проекта "Протеом человека" - составление протеомных карт плазмы крови, печени и мозга, а также проведение антигенного картирования генома. Кроме того, специальный комитет в составе проекта рассматривает новые технологические инициативы. Российский центр проекта принимает участие в разработке протеомной карты плазмы крови и печени, активно развивает новые подходы в области нанотехнологий.

Схема проведения протеомного анализа проста и основана на достижениях современной масс-спектрометрии. Образец, например плазма крови, отбирается у пациента в количестве чуть более 1 мл.. Очевидно, что в плазме крови присутствует множество различных белков. Разделение белков проводится методом двумерного электрофореза, и на двумерной электрофоре-грамме каждый белок предстает в виде отдельного пятна. Его интенсивность соответствует уровню экспрессии белка, то есть его количеству. Анализ гелей позволяет выявить индивидуальные вариации протеома, оценить статистические параметры для каждого пятна. Затем, сравнивая электрофореграмму с эталонными, удается выявить различия, связанные с заболеваниями. Различия заключаются в повышении или понижении экспрессии белка, некоторые белки появляются в плазме больных, тогда как другие могут исчезнуть. Однако на этапе анализа двумерных электрофореграмм речь на самом деле еще не идет о конкретных белках, а только об интенсивности пятен. Для того чтобы определить (идентифицировать) белок, пятно вырезают из геля, подвергают расщеплению, и массы фрагментов (пептидов) детектируют с помощью масс-спектрометрии.

Протеомный анализ сопряжен с проведением ряда трудоемких рутинных процедур, связанных с тем, что число анализируемых белков велико, а для статистической значимости результата требуется обработать большое количество образцов в соответствии со стандартным протоколом. Снятые масс-спектры передаются в программу идентификации белков. Профиль масс, полученный на масс-спектрометре, соответствующий пептидным фрагментам белка, позволяет однозначно его идентифицировать, проведя поиск соответствия с теоретическими профилями, построенными по белкам человеческого генома через специализированные компьютерные базы данных в сети Интернет в онлайн-режиме.

Постгеномная эра открывает широкие перспективы перед российскими учеными - в исследованиях по данному направлению сейчас участвует около десяти научно-исследовательских институтов РАН, РАМН, Минздрава России, Минпромнауки России и МГУ, которые располагают мощной аппаратной базой с квалифицированным техническим персоналом и значит есть потенциал для дальнейшего развития.

Для врача молекулярная карта заболевания - это ключ к точному диагнозу, прогнозу и целенаправленной терапии болезни.

Для исследователя молекулярная карта заболевания - базис для новых открытий.



Рисунок 2 - Молекулярная (протеомная) карта и терапия человека

3. МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЙ ПОДХОД В ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИНОВАЦИОННЫХ ПРОТЕОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Передовые методы медицинской диагностики, стоящие на стыке таких наук, как медицина, химия, физика и биология, требуют системного подхода к информационному обеспечению, которое в данном случае должно обеспечивать получение, хранение, обработку м анализ результатов исследований.

Междисциплинарная аналитическая лаборатория, имеющая уникальную базу высокотехнологичного медицинского диагностического оборудования, предполагает разработку новых подходов к еѐ информационному обеспечению.

Консультативно-диагностическая база междисциплинарной лаборатории (центра) включает 6 научных блоков:

Протеомные и фармакопротеомные исследования биологических жидкостей и тканей организма человека;

Исследование индивидуальной чувствительности к лекарственным средствам;

Исследование биоэквивалентности лекарственных средств;

Разработка и клинические испытания лекарственных средств (I фаза);

Информационные стандарты лекарственных средств;

Фармакоэпидемиологические исследования и регистрация ПЭ при применении лекарственных средств.

Консультативно-диагностическая база объединяет 6 подразделений лабораторных методов, оснащенных передовым, высокотехнологическим оборудованием:

Подразделение ВЭЖХ/МС;

Подразделение новых электрофоретических методов исследования; Подразделение ПЦР;

Подразделение спектрофотометрических методов исследования; Подразделение MALDI-TOF-MC;

Подразделение иммунохимических методов исследования.

Результаты работы всех вышеперечисленных научных блоков и подразделений лаборатории внедряются на уровне консультативного подразделения по клинической фармакологии [4].

Информационную платформу для биомедицинской лаборатории можно представить в виде схемы, объединяющей три блока: эпидемиология и фармакоэпидемиология, молекулярные исследования и базы данных.

Получая большое количество клинической информации и данные эпидемиологических исследований в медицине с помощью высокотехнологичных методов исследования, анализа и обработки их результатов, идентификации полученной информации, формируются базы данных, которые затем посредством информационных технологий применяются во всех областях медицинской деятельности и способствуют решению следующих задач:

развитию генодиагностики и генотерапии;

формированию медико-генетических методов исследования на этапе первичной медицинской помощи;

развитию фармакогеномных принципов диагностики и терапии при назначении лекарств;

развитию исследований фармацевтической эквивалентности и биоэквивалентности лекарственных средств; созданию банка данных генетических полиморфизмов и протеомных паттернов заболеваний у здоровых лиц и пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время прогресс в биомедицине обусловлен появлением новых электрофоретических методов исследования, методов ПЦР, ВЭЖХ и МС. Их эффективное применение связано с усовершенствованием способов первичной подготовки биологических образцов для исследования и развитием клеточных технологий. Соединение возможностей этих методов способствует созданию единых технологических платформ для реализации программ фундаментальных и прикладных исследований в области биомедицины, фармакологии и фармации.

Развитие новых технологических платформ для биомедицинских и фармацевтических исследований происходит на основе нанотехнологических решений.

Открытия в области расшифровки генома человека, геномов патогенных микроорганизмов, а также интересные результаты протеомных исследований биологических жидкостей и тканей организма человека способствуют появлению новых терапевтических агентов для лечения многих социально значимых заболеваний. Мощный потенциал открытий в области геномики, протеомики, метаболомики для разработки генотерапии и новых лекарственных препаратов можно реализовать в полной мере на основе новых технологических платформ и с учетом современных стандартов их проведения.

Важной задачей является создание полноценного биоинформационного ресурса, который станет мощной базой для планирования новых экспериментальных разработок, для интерпретации новых результатов геномных, протеомных исследований, а также для выполнения работ по предиктивной фармакологии. Будущее биоинформатики связано с развитием экспериментальной геномики для пациентов с разработкой типичного сценария развития организма человека, начиная с постнатального периода, что должно произвести революцию в медицине и здравоохранении.

Передовые методы биомедицинской диагностики, стоящие на стыке таких наук, как медицина, физика и биология, требуют системного подхода к информационному обеспечению, которое в данном случае должно способствовать получению, хранению, обработке, анализу и обмену результатами исследований в рамках выполнения многоцентровых программ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арчаков А.И. Биоинформатика, геномика и протеомика - науки о жизни XXI столетия//Вопр. мед. химии. 2000. № 1. С. 13 - 18.

. Арчаков А.И. Что за геномика? - Протеомика//Вопр. мед. химии. 2000. № 1. С. 19 - 24.

. Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. - СПб.: Спец. лит, 1997. - 287 с.

. Горшкова Ю.В., Трегубов А.В. Информационные технологии в лаборатории прикладной фармакокинетики//Проблемы стандапртизации в здавоохранении. 2005. № 11. С. 129 - 132.

. Ивахно С., Карнелюк А. Количественная протеомика и еѐ применение в системной биологии//Биохимия. 2006. Т. 71. № 10. С. 1312 - 1327.

. Сарвилина И.В., Каркищенко В.Н., Горшкова Ю.В. Междисциплинарные исследования в медицине. - М.: Техносфера, 2007. - С. 15 - 56.

7. Blackstone N.B., Green D.R. The evolution of mechanism of cell suicid//Bioessays. 1999. Vol. 21. № 1. pp. 84 -88.

. Fiser A. Protein Structure modeling in proteomics era// Expert Rev. Proteomics. 204. Vol. 1. № 1. pp. 97 - 110.

. Gerber S.A., Rush J., Stemman O. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS//PNAS. USA. 2003. Vol. 100. № 12. pp. 6940 - 6945.

. Lander E.S. Array of Hope//Nature Genet. 1999. Vol. 21. pp. 3 - 4.