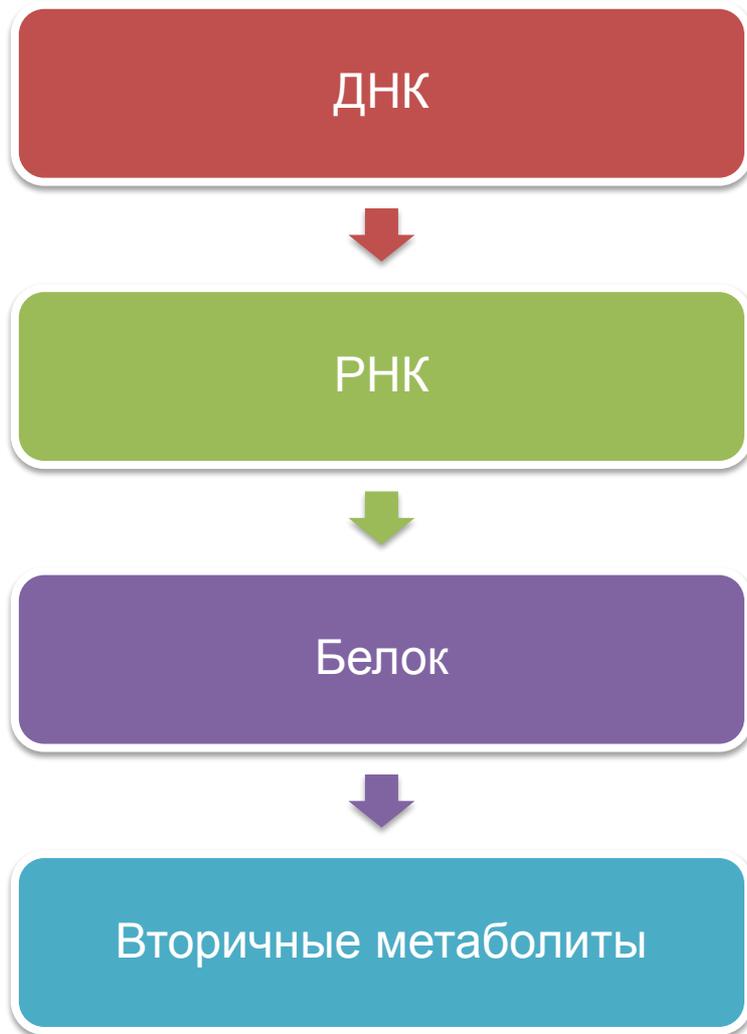


Протеомика

Методы молекулярной биологии и
биинформатики в изучении белков

Парадигма молекулярной биологии

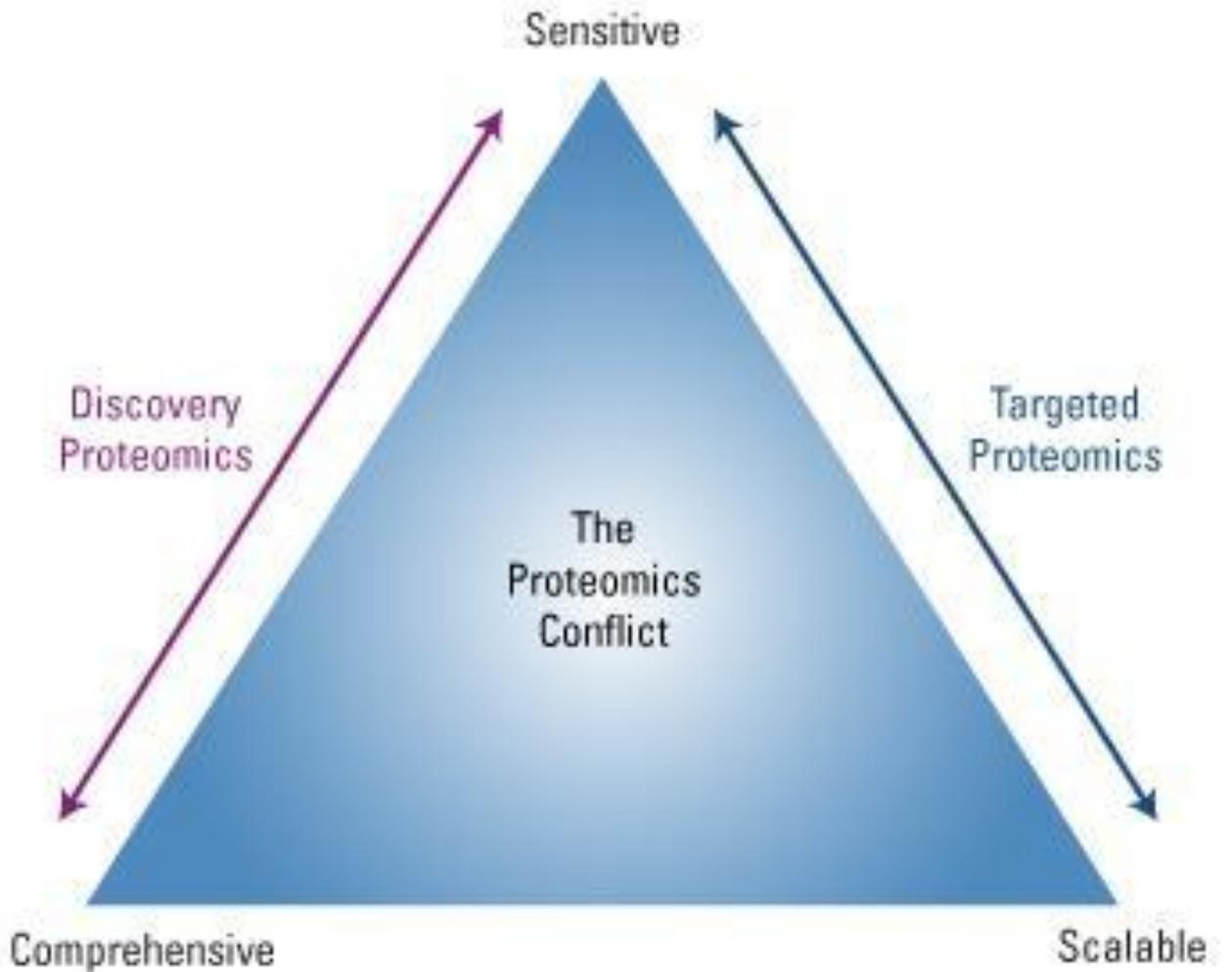


Протеомика

- Протеомика – область науки, изучающая белки, их функции и взаимодействия.
- В протеомике главным образом применяются высокопроизводительные методы анализа.
- Proteomics = protein + *omics*
- Протеом (proteome) – совокупность всех белков клетки, ткани, организма, включая модификации этих белков.

Протеомика

- таргетная
- нетаргетная



Протеомика

- Качественный анализ
 - установление структуры нового белка
 - альтернативный сплайсинг
 - посттрансляционные модификации (ПТМ)
- Количественный анализ (относительный и абсолютный)
 - оценка экспрессии
 - оценка ПТМ

Посттрансляционные модификации

Белки не являются статичными в клетке и подвергаются различным обратимым и необратимым модификациям:

- Фосфорилирование
- Гликозилирование
- Убиквитинирование
- S-нитрозилирование
- Метилирование
- N-ацетилирование
- Связывание с липидами

Посттрансляционные модификации

- **Фосфорилирование** – наиболее частый механизм регуляции функций белка и передачи сигналов путём изменения конформации (влияет на клеточный цикл, рост, апоптоз и сигнальные пути)
- **Гликозилирование** – наиболее разнообразный механизм (обеспечивает фолдинг, присоединение фосфолипидов, влияет на транспорт белков, адгезию клеток, взаимодействие белков/белок-лиганд, растворимость)
- **Убиквитинирование** – образование пептидной связи белок-убиквинтин (полиубиквитинирование распознаётся протеасомами и ведёт к деградации белка)

Посттрансляционные модификации

- **S-нитрозилирование** – присоединение NO к цистеину (влияет на сигнальные механизмы)
- **Метилирование** (повышает гидрофобность и снижает отрицательный заряд, метилирование гистонов влияет на доступность ДНК для транскрипции)
- **N-ацетилирование** – замена метионина на ацетильную группу – 80-90% белков, ацетилирование лизина в гистонах (регуляция транскрипции – гипoaцетелирование гистонов)
- **Связывание с липидами** обеспечивает доставку в органеллы, везикулы и через клеточную мембрану.

«Мокрые» методы протеомики

- Электрофорез
 - SDS-PAGE
 - Native-GE
 - 2D-PAGE
 - Капиллярный ЭФ
- Блоттинг
- Иммунопреципитация и обработка ферментами
- Жидкостная хроматография
- Масс-спектрометрия (LC-MS(/MS), MALDI-TOF-MS(/MS), ...)

Пример рабочего процесса

Эксперимент

Выделение тотального белка

Разделение белков / пептидов

Детекция

Обработка данных

Пример рабочего процесса

Эксперимент

Выделение белка

Изоэлектрофокусировка

SDS-PAGE

Обработка трипсином (tryptic digest)

Масс-спектрометрия MALDI-TOF-MS

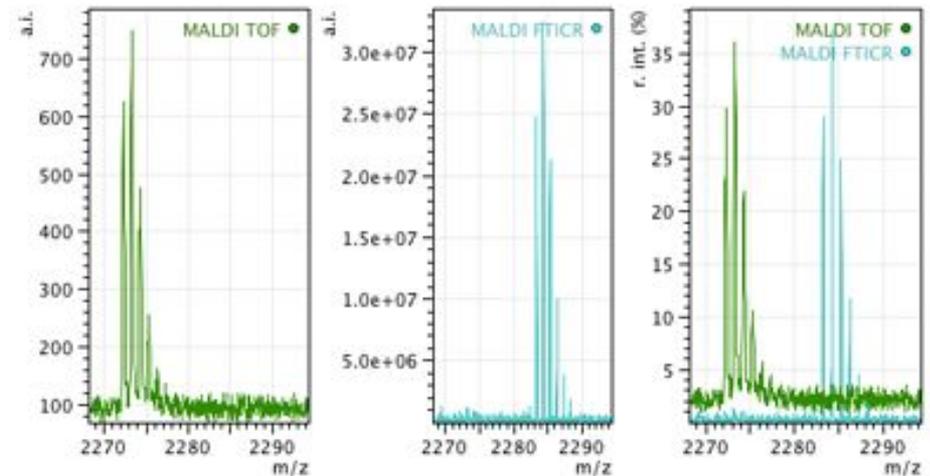
Идентификация белков в Mascot

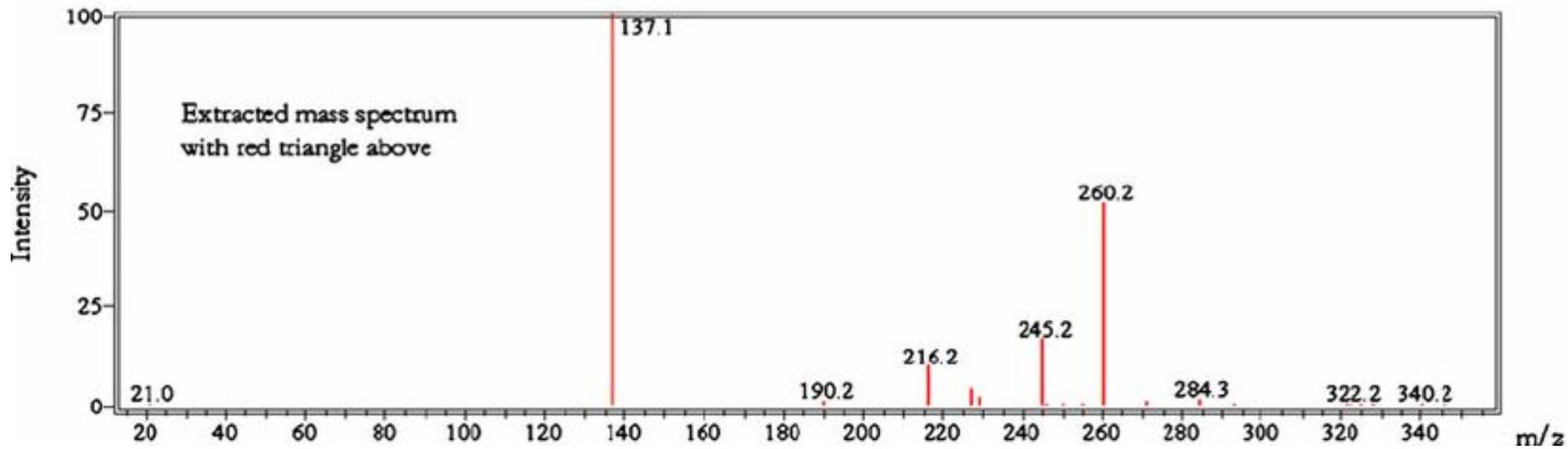
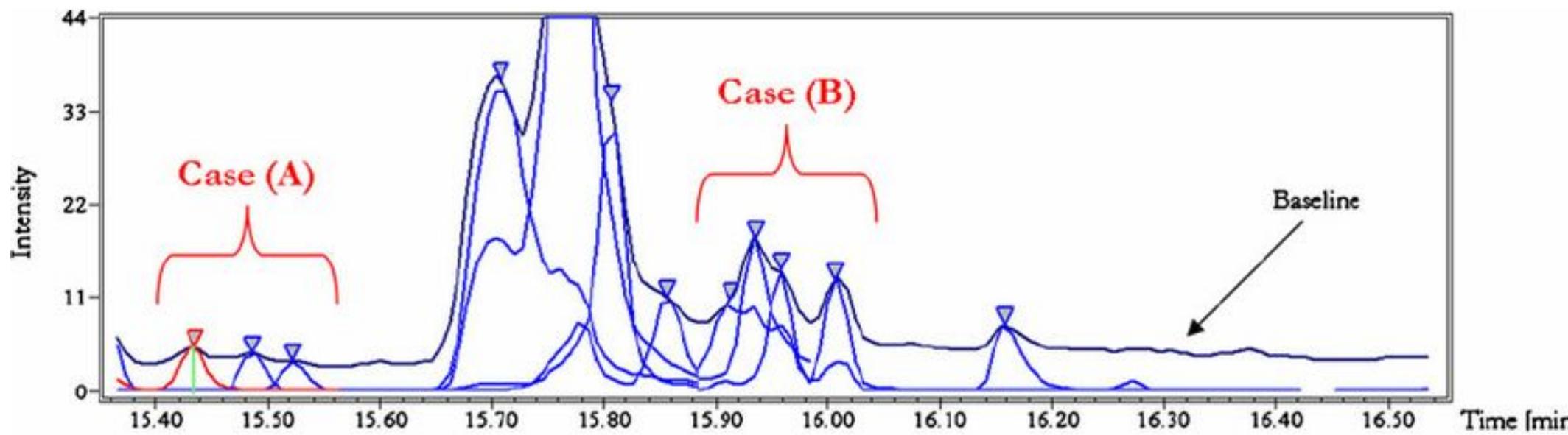
Масс-спектрометрия в протеомике

- МС позволяет получить сведения о массе и фрагментации полипептидов.
- Детекция
 - нетаргетная TOF/TOF, Orbitrap, Fourier transform MS.
 - таргетная: QQQ, Ion trap, QTOF, Q Trap.
- С помощью МС можно осуществить качественный и количественный анализ:
 - мечение стабильными изотопами
 - изобарные (масс-тандемные) метки
 - внутренние стандарты и SRM/MRM

Работа с данными масс-спектрометрии

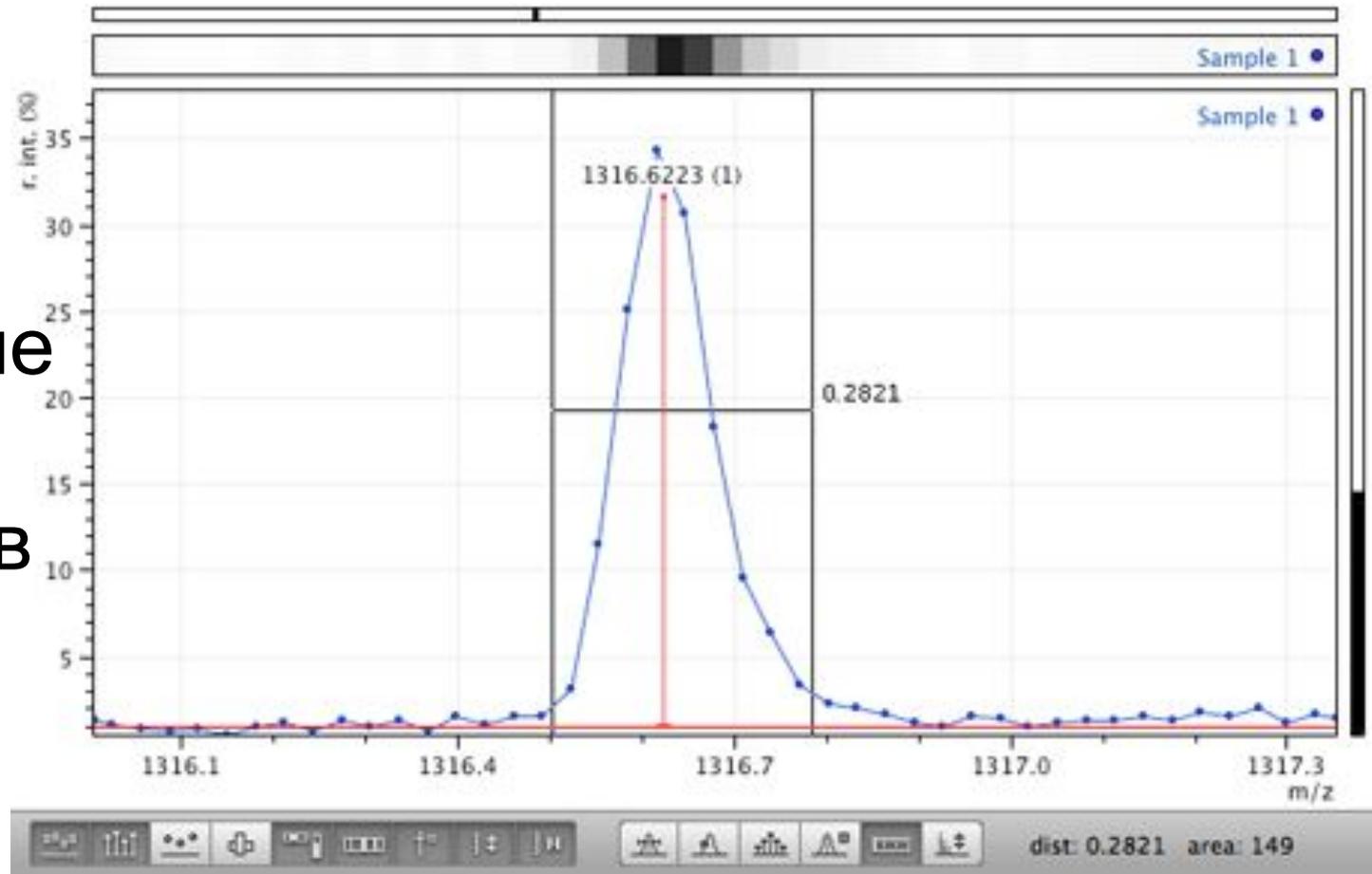
- Оценка предварительных данных (pI , M_w , ...)
- Поиск пиков
- Идентификация пептидов и белков
- Оценка значимости, поиск и объяснение различий





Поиск пиков

- Поиск пиков
- Определение m/z , Tr
- Формирование файла со списком пиков
- MZmine2
- mMass



Идентификация пептидов

- Peptide Mass Fingerprint – полипептид даёт определенный набор пиков, отвечающий массам его фрагментов.
 - Mascot (<http://www.matrixscience.com/>)
 - MzJava
 - PepFrag
 - xQuest
- Моделирование спектров
 - mProphet

Peptide Mass Fingerprint

- Сырые данные должны быть переведены в список пиков.
- Параметры поиска должны быть оптимизированы с использованием стандартов (BSA).
- Необходимо учитывать возможность контаминации.
- Необходимо указывать конкретный используемый для лизиса фермент.
- Необходимо оценивать достоверность результатов.

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name Email

Search title

Database(s) Enzyme

Allow up to missed cleavages

Taxonomy

Fixed modifications

Display all modifications

Variable modifications

Acetyl (K)
Acetyl (N-term)
Acetyl (Protein N-term)
Amidated (C-term)
Amidated (Protein C-term)
Ammonia-loss (N-term C)
Biotin (K)
Biotin (N-term)
Carbamidomethyl (C)
Carbamyl (K)
Carbamyl (N-term)

Protein mass kDa Peptide tol. Da

Mass values MH⁺ M_r M-H⁻ Monoisotopic Average

Data file No file selected.

Query

Data input

Decoy Report top hits

Инструменты протеомики

Коллекции инструментов:

- <http://www.expasy.org/tools/>
- <http://www.ms-utils.org/wiki/pmwiki.php/Main/SoftwareList>

Пример рабочего процесса

Эксперимент

Выделение белка

Изоэлектрофокусировка

SDS-PAGE

Обработка трипсином (tryptic digest)

Масс-спектрометрия MALDI-TOF-MS

Обработка данных в Mascot

Моделирование структуры белка

- SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org/>)
 - выравнивание белков
 - построение модели по наиболее близкому белку
- FoldX
 - оптимизация структуры белка
 - оценка влияния мутаций и изменения условий на стабильность белка.
- Предел – примерно 30% идентичности.

Моделирование структуры белка de novo

- Предсказание вторичной структуры по первичной и третичной по вторичной.
- Предсказание вторичной структуры и поиск по базам данных о фолдинге для схожих структур.
- Предсказание третичной структуры по оценке энергии взаимодействия аминокислот в зависимости от "скелета", моделирующего определённую конформацию.

ПО для моделирования

- Rosetta / Robetta
- QUARK
- UniCon3D
- Pep-Fold
- PyMOL