

Высокопроизводительные
omics-технологии,
применяемые
в системной биологии



***Omics*-технологии** — это оценка больших массивов данных о генах, белках или метаболитах биологического объекта путем обработки переменных средствами многомерной статистики, дисперсными регрессионными анализами, а также программами распознавания образов.



1 ГЕНОМИКА

Это область молекулярной генетики, посвящённая исследованию генома и генов живых организмов.

Цель геномики – получение информации обо всех потенциальных свойствах клетки, которые не реализуются на данный момент, например, «молчащие гены».

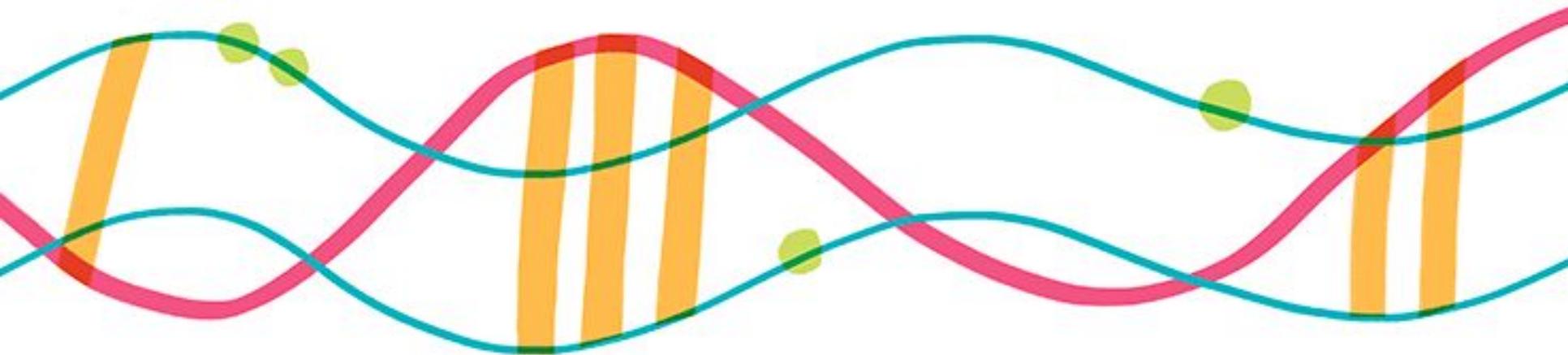
Задача геномики – установление полной генетической характеристики всей клетки: количества содержащихся в ней генов, нуклеотидов и их последовательности, определение функций каждого гена по отношению к метаболизму организма или применительно к его жизнедеятельности.

Геномика

Структурная

Сравнительная
(эволюционная)

Функциональная
(метаболическая)



СТРУКТУРНАЯ ГЕНОМИКА. ПРЕДМЕТ. ЗАДАЧИ. МЕТОДЫ.

изучение содержания и организация геномной информации

ЗАДАЧИ

Изучение последовательность нуклеотидов в геноме

Определение границ и строения генов

Определение границ и строения межгенных участков и регуляторных генов

МЕТОДЫ

Экспериментальные

Моделирование

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМИКА

изучает сходства и различия в организации геномов разных организмов

ПОИСК МИНИМАЛЬНОГО ГЕНОМА

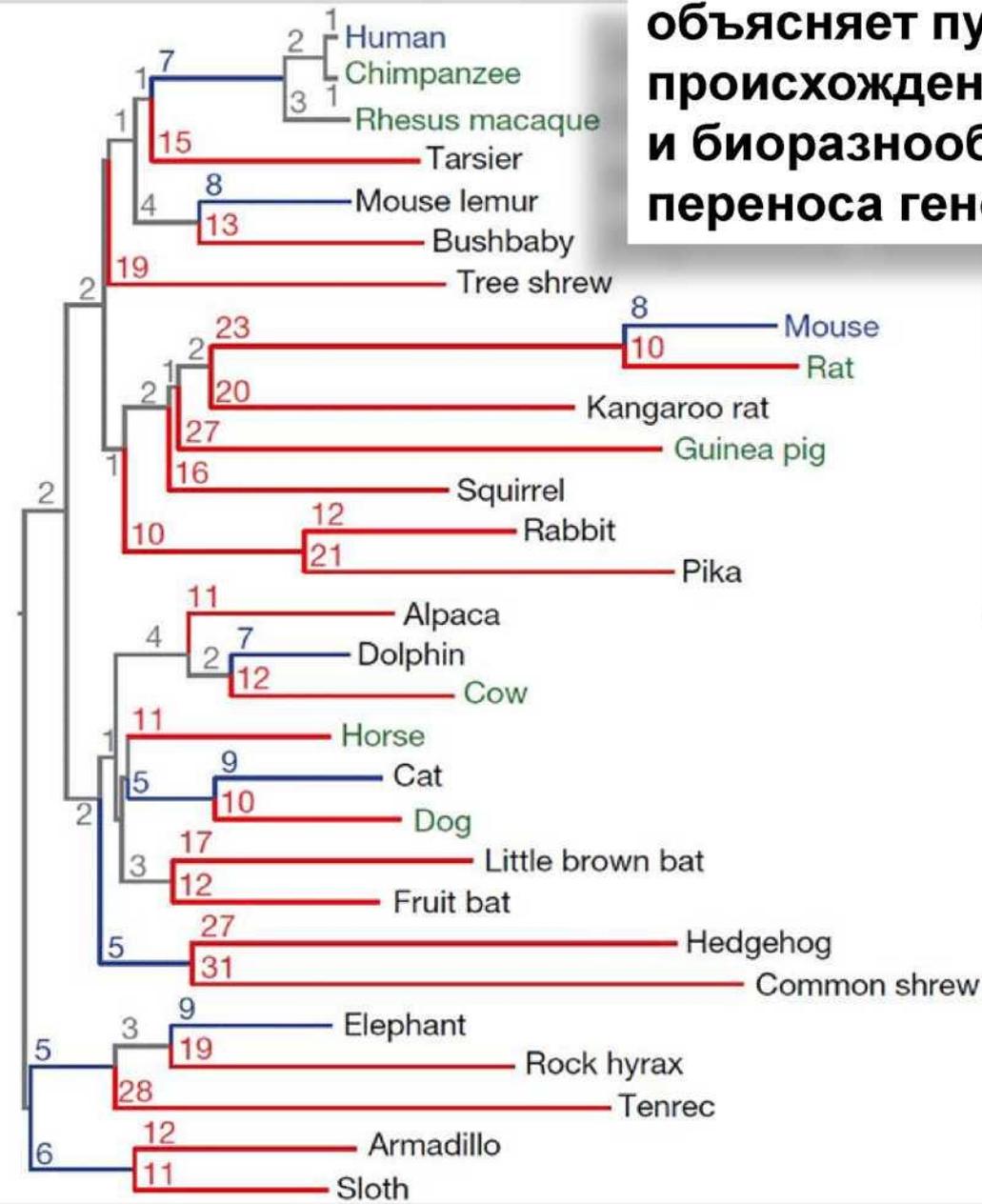
<i>B.subtilis</i> 300 genes/~4000 (Itaya, 1995)	<i>M.genitalium</i> 265 genes / 482 (Hutchison et al., 1999) 382 genes / 482 (Hutchison et al., 2006)	<i>H.influenzae</i> 670 genes/ ~1272 (Akerley et al. 2002)	<i>E.coli</i> 620 genes / 3746 (Gerdes et al. 2003) 234 genes / 2994 (Hashimoto et al. 2005)
<i>S.cerevisiae</i> 1105 genes/ 5916 (Giaever et al. 2002)	<i>C.elegans</i> 1722 genes/ 19427 (Kamath et al. 2003)	<i>S.aureus</i> 150 genes (Yi et al. 2001)	<i>S.pneumoniae</i> 110 genes (Thanassi et al. 2002)

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМИКА

2 genomes 256 genes (Mushegian & Koonin 1996)	34 genomes 80 genes (Harris et al 2003)	100 genomes 60 genes (Koonin et al. 2003)	147 genomes 35 genes (Charlebois & Doolittle 2004)
---	---	---	--

ЭВОЛЮЦИОННАЯ ГЕНОМИКА

объясняет пути эволюции геномов, происхождение генетического полиморфизма и биоразнообразия, роль горизонтального переноса генов



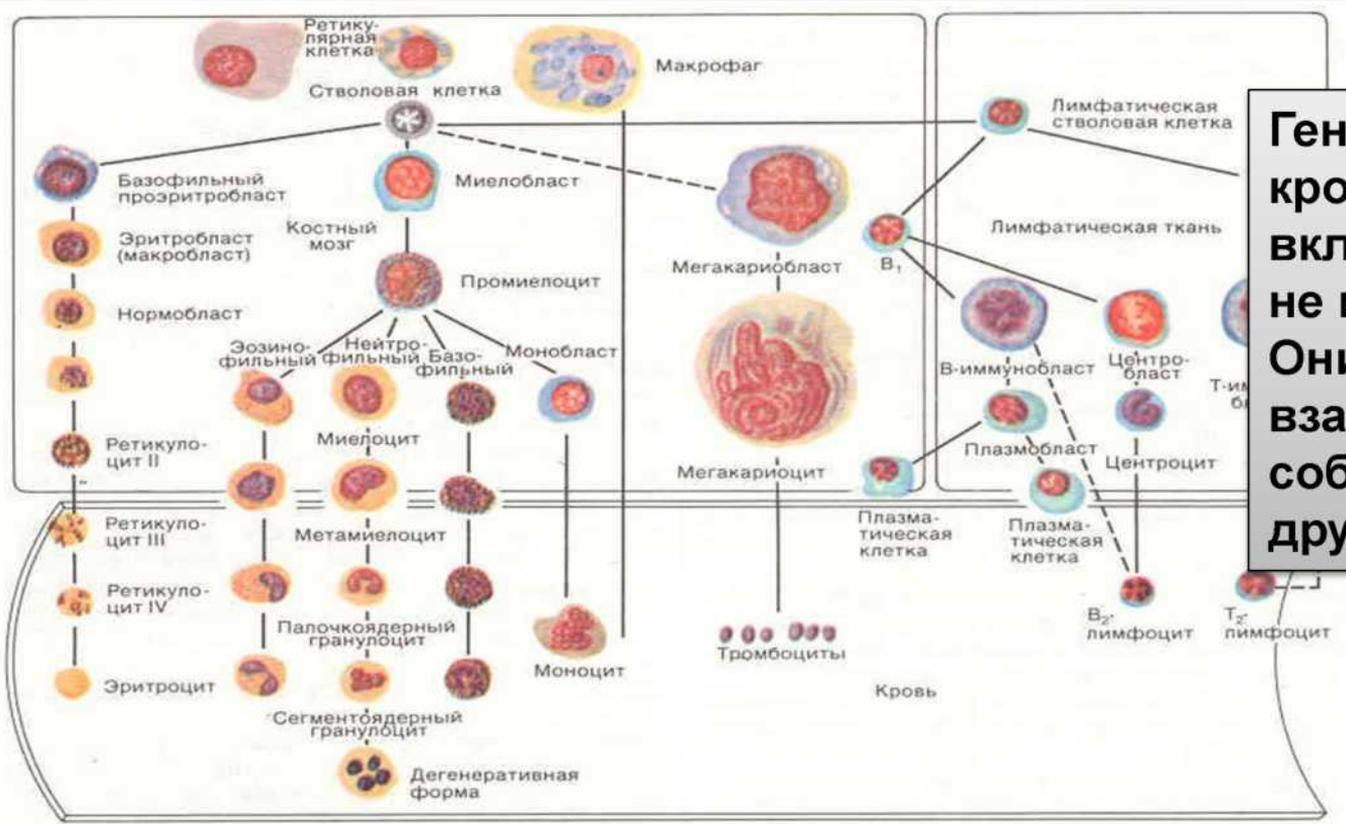
Эволюционное дерево 29 видов плацентарных млекопитающих. **Синим** выделены полностью прочтенные геномы, **зеленым** – высококачественные, **черным** – менее качественные «черновики».

Цифрами показано количество нуклеотидных замен (на 100) для каждой ветви дерева. **Красным** выделены ветви с более чем десятью заменами на 100 нуклеотидов.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕНОМИКА

исследует функции структурных и регуляторных генов, их взаимодействие в клеточной системе

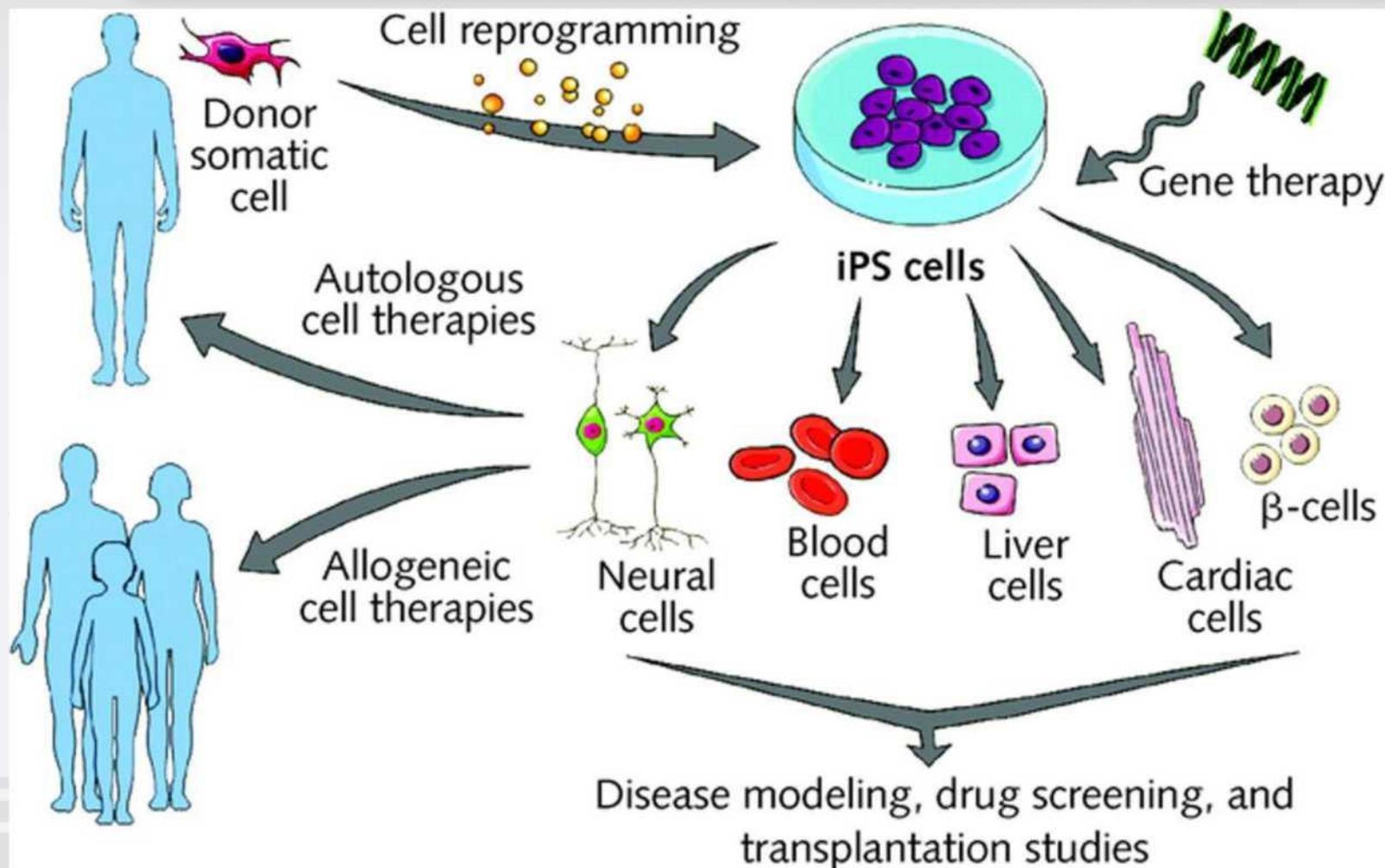
Важнейшая задача – создание «генной сети», т.е. схемы взаимосвязанной работы генов



Генная сеть системы кроветворения включает в себя работу не менее 500 генов. Они не только взаимосвязаны между собой, но связаны и с другими генами.

МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНОМИКА

решает прикладные вопросы клинической и профилактической медицины на основе знания геномов человека и патогенных организмов



ФАРМАКОГЕНОМИКА

Это область геномики, исследующая, каким образом совокупность наследственной информации человека может влиять на эффект от принимаемых этим человеком лекарств.

Фармакогеномика связывает экспрессию конкретного гена или однонуклеотидного полиморфизма в геноме человека с эффективностью или токсичностью лекарства для того, чтобы разработать рациональные средства оптимизации фармакотерапии, и учитывает генотипы людей для обеспечения максимальной эффективности при минимальных побочных действиях («*персонафицированная медицина*»).



ТОКСИКОГЕНОМИКА

Это научное направление, изучающее геномы с точки зрения их реакции на разные стрессорные условия окружающей среды и токсины, роль генно-средовых взаимодействий в развитии разного рода заболеваний и дисфункций.

Цель токсикогеномики – найти корреляцию между реакциями на токсиканты и изменениями в генетических профилях объектов, подвергнутых воздействию таких токсикантов.

Основным инструментом токсикогеномики является ДНК-чип, который используют для одновременного мониторинга уровня экспрессии сотен и тысяч генов.

КОГНИТИВНАЯ ГЕНОМИКА

(геном и сознание)

Изучает гены и некодирующие последовательности, необходимые для развития и функционирования головного мозга.

Сопоставляя геномы разных животных, можно определить, какие гены обеспечивают особенности нервной системы человека, его поведение и интеллектуальные способности.

Эти подходы используются и для выявления генетических факторов развития болезней нервной системы (синдрома Дауна, болезни Альцгеймера и др.).

ЭПИГЕНОМИКА / ЭПИГЕНЕТИКА

Это область генетики, изучающая изменения экспрессии генов или фенотипа клетки, вызванных механизмами, не затрагивающими последовательности ДНК (например, метилирование ДНК и деацетилирование гистонов).

Методы эпигенетических исследований:

- Иммунопреципитация хроматина (различные модификации ChIP-on-chip и ChIP-Seq);
- гибридизация *in situ*;
- чувствительные к метилированию рестриктазы, идентификации ДНК-аденинметилтрансферазы (DamID);
- бисульфитное секвенирование;
- методы биоинформатики (компьютерная эпигенетика).

2 МЕТАГЕНОМИКА

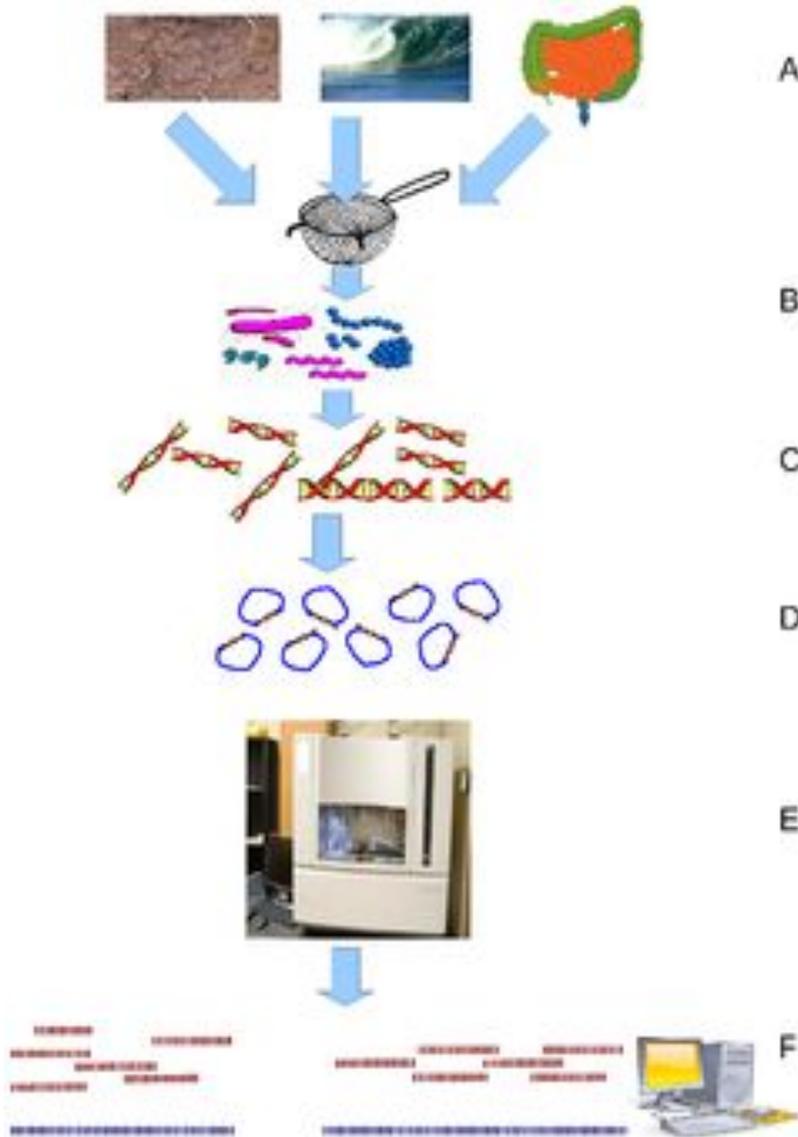
Это раздел молекулярной генетики, изучающий генетический материал всех микроорганизмов, находящихся в образце среды (метагеном).

Метагеномный анализ позволяет определить видовое разнообразие некультивируемых бактерий наравне с культивируемыми.

Метагеномику применяют для решения практических проблем в медицине (проекты «Микробиом Человека» и «MetaHit»), инженерии, сельском хозяйстве и экологии.

Расшифровка метагенома заключается в секвенировании нуклеотидных последовательностей в молекулах ДНК.

Схема секвенирования метагенома с использованием случайного фрагментирования



A (A) - получение образца окружающей среды;

B (B) - разделение составляющих образца (например, по размеру);

C (C) - лизис клеток и выделение ДНК;

D (D) - клонирование и создание библиотеки клонов;

E (E) - секвенирование;

F (F) - сборка в контигии и скаффолды (клеточные матрицы).

3 ТРАНСКРИПТОМИКА

[от лат. *transcriptio* – переписывание] – это идентификация всех матричных РНК, кодирующих белки, определение количества каждой индивидуальной мРНК и закономерностей экспрессии всех генов, кодирующих белки.

Задача транскриптомики - выявление и изучение не зависящих от геномных сигналов факторов, влияющих на формирование структуры и динамики транскриптома, и, в конечном счете, протеома.

Методы транскриптомики

- **SAGE** (*Serial analysis of gene expression*) - серийный анализ экспрессии генов;
- **ESTs** (*Expressed Sequence Tags*) - прочитанные фрагменты экспрессированных последовательностей;
- **MPSS** (*Massively Parallel Signature Sequencing*) - массовое одновременное секвенирование характерных фрагментов;
- **метод ДНК-биочипов или ДНК-микроматриц** (*DNA microarray, DNA biochip, oligonucleotide microarray, cDNA microarray*).

«Серийный анализ экспрессии генов» (*SAGE*) — молекулярно-генетический метод, позволяющий одновременно количественно и качественно охарактеризовать экспрессию тысяч различных генов путем анализа их транскриптов.

Два основных принципа лежат в основе *SAGE*:

- a. короткие нуклеотидные последовательности ДНК («ярлыки») (10-14 п.н.), достаточные для идентификации индивидуальных генных продуктов;
- b. связывание таких ярлыков друг с другом в одну последовательность, что многократно увеличивает эффективность идентифицирования экспрессированной мРНК в библиотеках.

«Прочитанные фрагменты экспрессированных последовательностей» (*ESTs*)

Это очень мощный метод для глобального компьютерного анализа структуры транскриптов, реконструкции структуры генов и измерения уровней экспрессии генов.

ESTs – это короткие (обычно около 300-500 bp), прочитанные за один раз фрагменты кДНК. Они представляют собой «слепок», «отпечаток» с продуктов гена, проэкспрессированных в определенной ткани или на определенной стадии развития. Они являются метками (tags) экспрессии гена для определенной библиотеки кДНК.

4 ПРОТЕОМИКА

Это наука, изучающая белковый состав биологических объектов, а также структурно-функциональные свойства белковых молекул.

Цель протеомики – установление и характеристика полного набора белков организма.

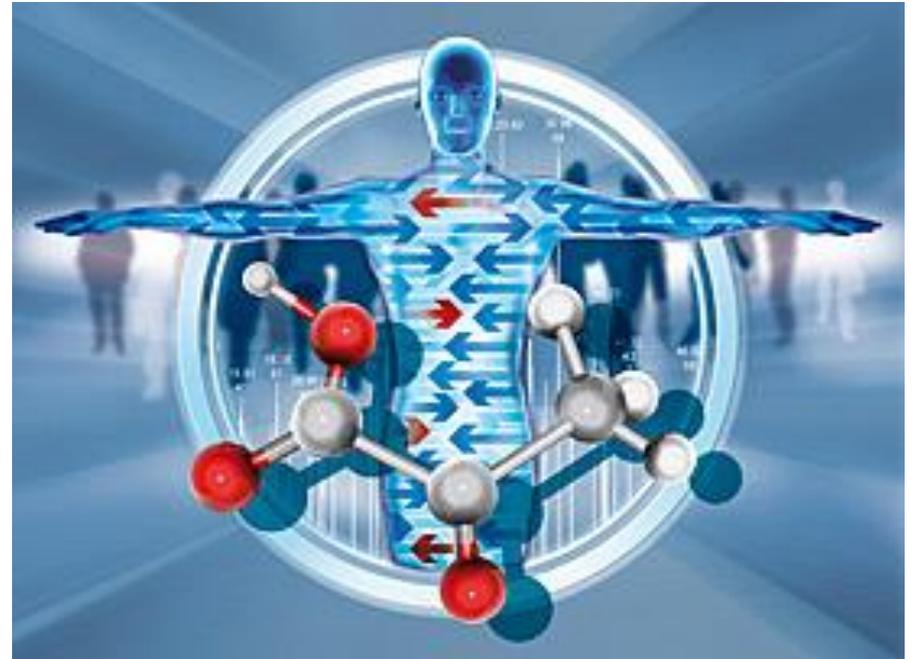
Задача протеомики – идентификация и количественное определение совокупных индивидуальных белков, которые содержатся в биологических образцах (*сыворотке крови, спинномозговой жидкости, моче, биоптатах*) на разных стадиях развития заболевания, а также на фоне проводимой терапии.

Протеомика

Структурная

Функциональная

Практическая

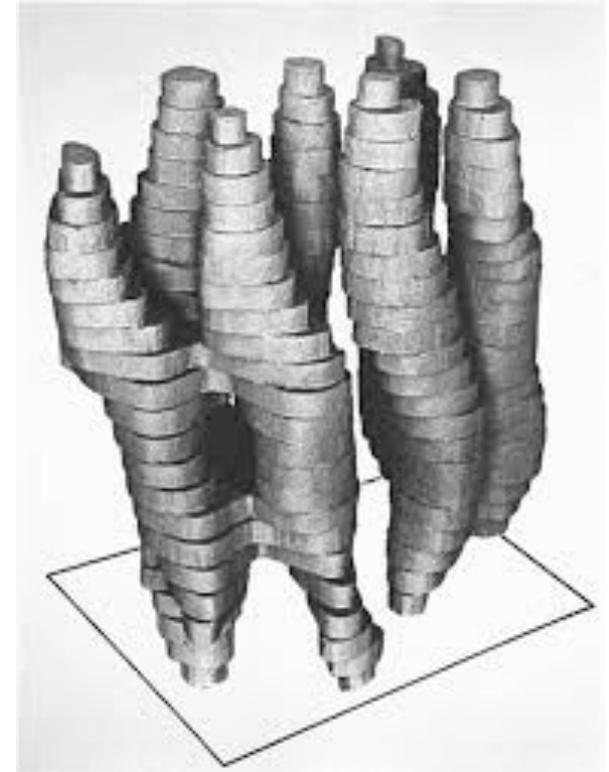


Структурная протеомика

Цель структурной протеомики – установление структуры всех белков живого организма.

Задачи структурной протеомики:

- выделение и очистка белков протеома;
- идентификация белков протеома;
- определение первичной, вторичной, третичной структуры белков;
- исследование внутримолекулярной динамики белков.



Первая белковая структура - структура **бактериородопсина**, полученная на основе данных электронной микроскопии (1975 г.)

Функциональная протеомика

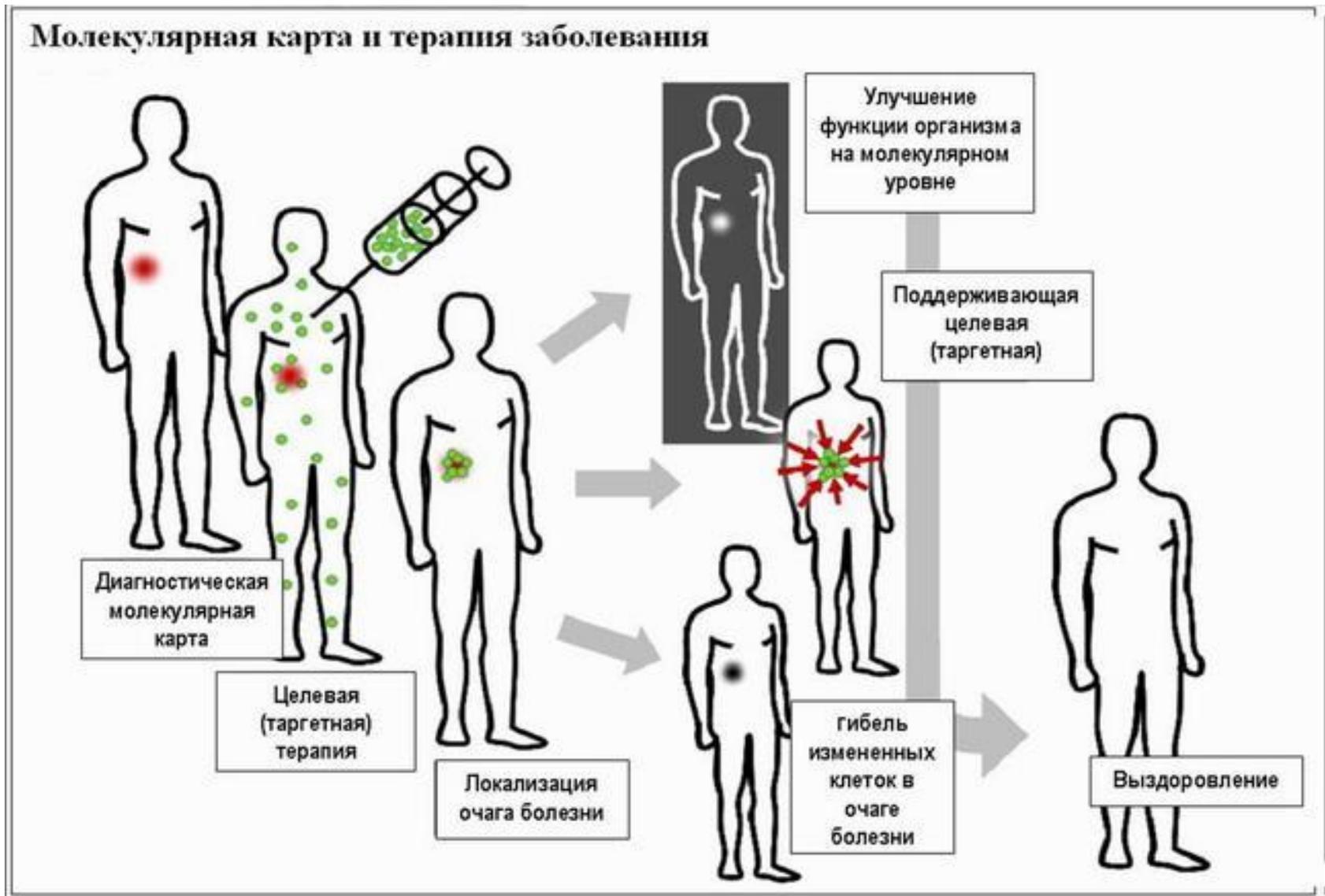
Цель функциональной протеомики - определение функциональных свойств протеома.

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.

Практическая протеомика:

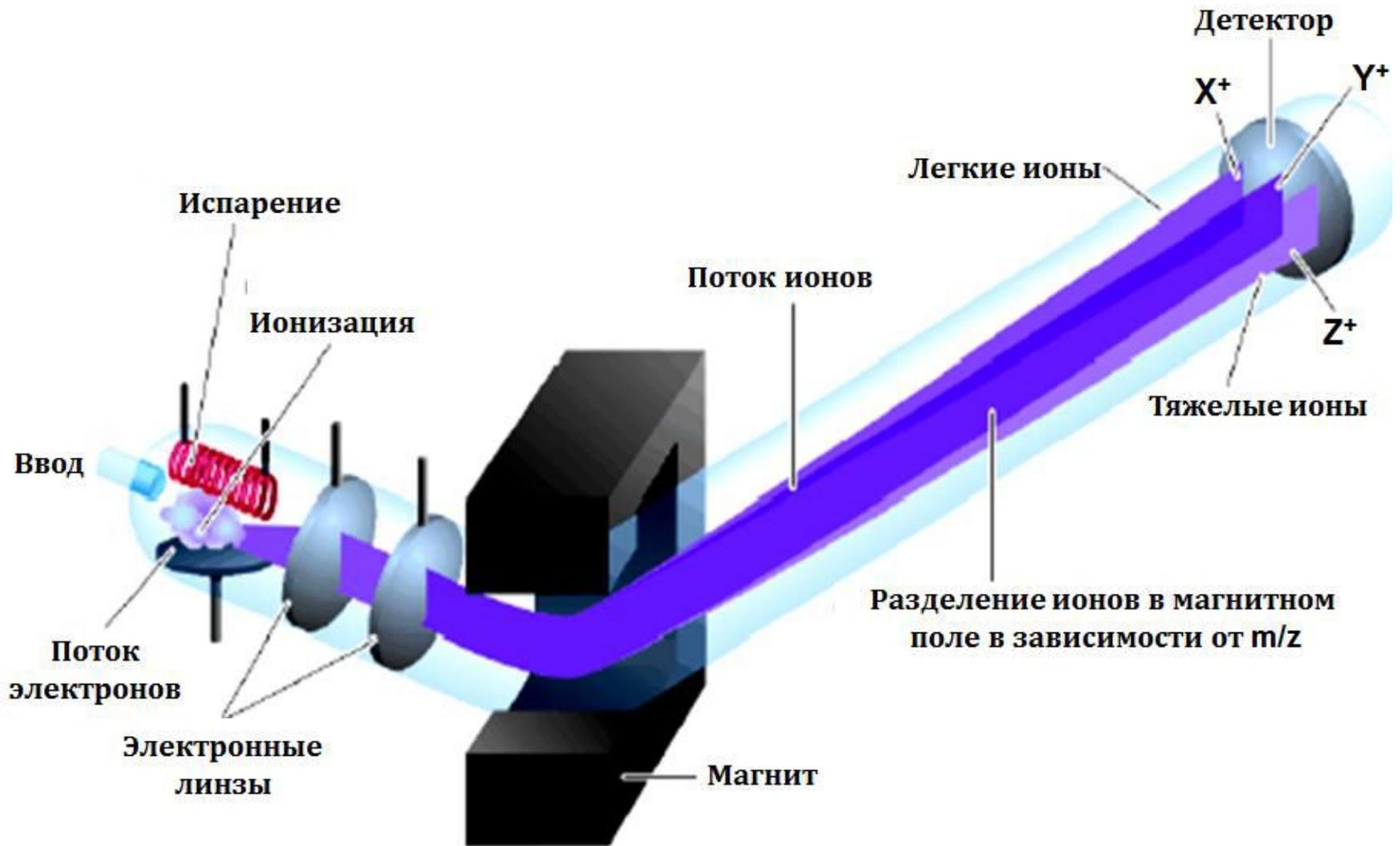
протеомное картирование



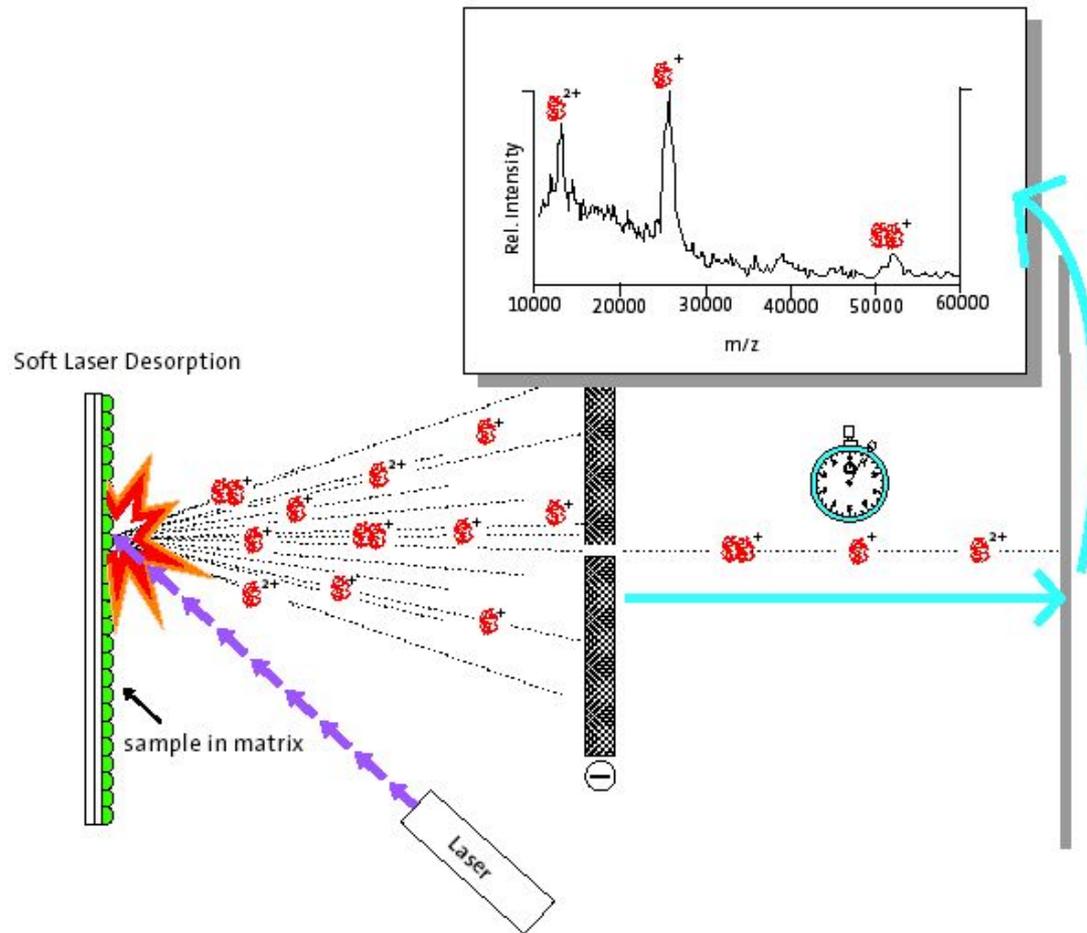
Основные протеомные технологии

- Одно- и двумерное электрофоретическое разделение белков
- лазерная захватывающая микродиссекция,
- комбинация методов 2D-электрофореза и времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI),
- хромато-масс-спектрометрия,
- микрочиповые технологии (SELDI),
- биосенсорные технологии

Схема масс-спектрометра



Лазерная десорбция (MALDI)



Матричная лазерная десорбция – метод, при котором исследуемое вещество помещают в «матрицу» - перемешивают с веществом, имеющим меньший молекулярный вес и обладающим высокой способностью поглощать лазерное излучение. Далее смесь на подложке помещают в прибор и облучают короткими лазерными импульсами. Вещество матрицы испаряется и захватывает с собой молекулы исследуемого вещества, которые частично ионизируются и увлекаются электрическим полем в масс-анализатор.

Двумерный (2D) электрофорез

H^+ — ГРАДИЕНТ pH — OH^-

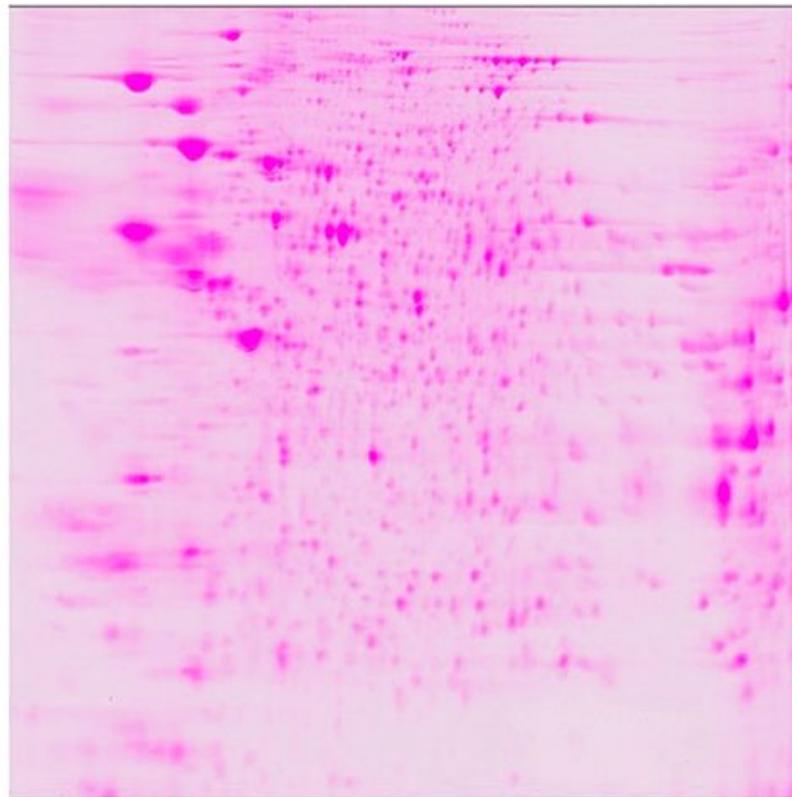
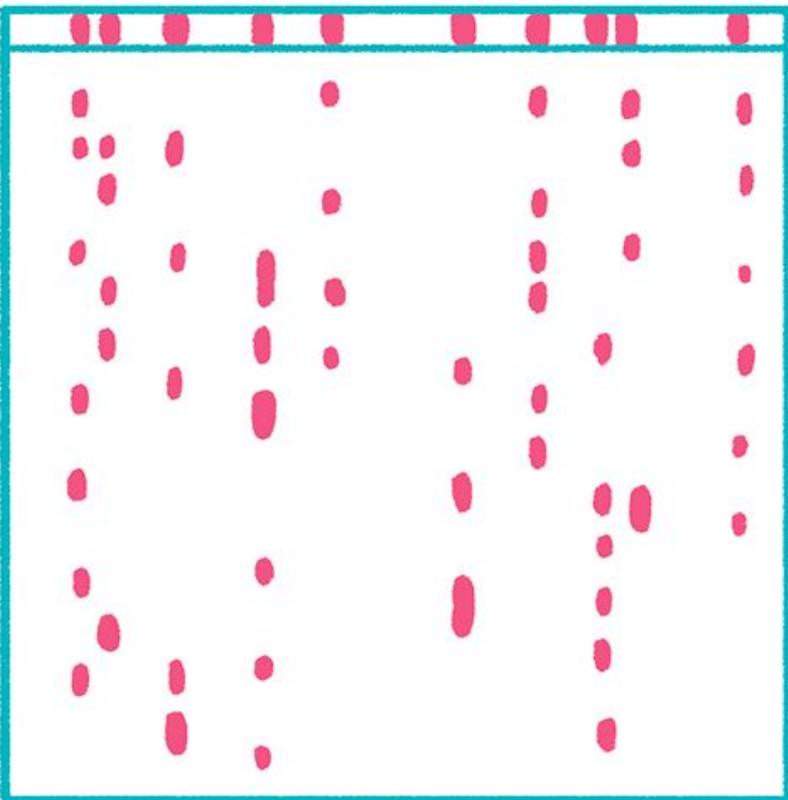


распределение белков в соответствии с изоэлектрическими точками молекул

1

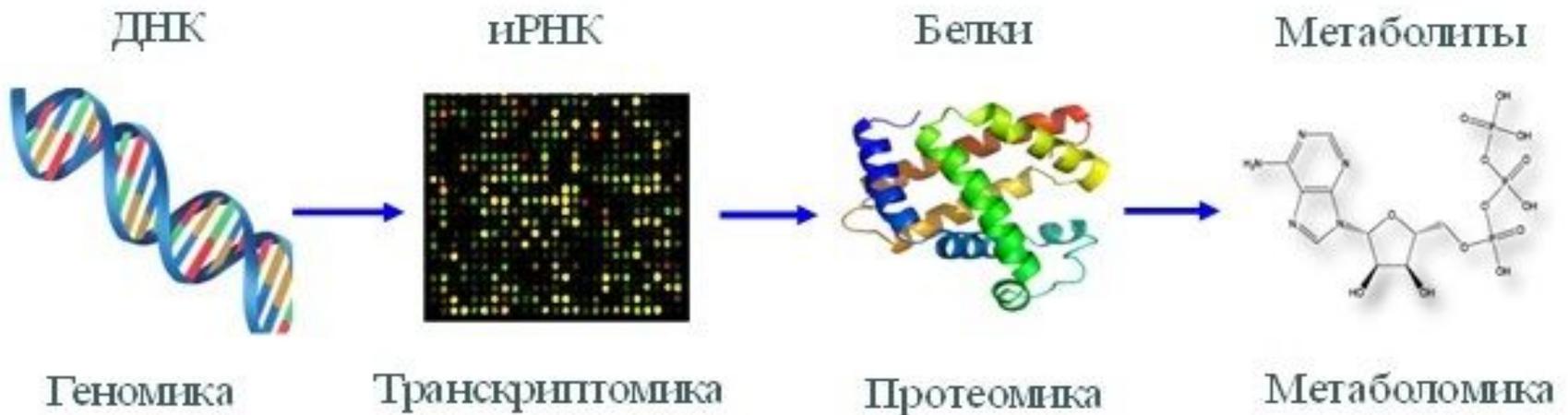
2

распределение белков в соответствии с молекулярными массами молекул



5 МЕТАБОЛОМИКА

Это технология, включающая в себя набор аналитических и биоинформационных методов для идентификации и количественного определения всех низкомолекулярных метаболитов с массой не более 1,5 кДа, присутствующих в клетке, ткани или целом организме.



МЕТАБОНОМИКА

Это количественное измерение динамического многопараметрического метаболического ответа живых систем на патофизиологические воздействия или генные модификации.

Метабономика использует метаболические профили для получения информации об изменениях метаболизма, связанных с внешними факторами окружающей среды, патологическими процессами и негенетическими изменениями.

КСЕНОМЕТАБОЛОМИКА

Это раздел метаболомики, основанный на анализе влияния ксенобиотиков на изменения метаболических процессов в организме человека. На этой основе проводится молекулярная диагностика патологий, обусловленных ксенобиотиками.

Ксенобиотики (греч. *xenos* - «чужой», *bios* - «жизнь») – это любые чуждые для организма химические вещества, вызывающие нарушения процессов жизнедеятельности (*тяжелые металлы, лекарственные средства, синтетические органические продукты бытовой и промышленной химии, синтетические полимерные материалы, нефтепродукты, пестициды, синтетические ПАВы*).

Аналитические методы метабомики / метабономики

1. Методы разделения:

- газовая хроматография;
- высокоэффективная жидкостная хроматография;
- капиллярный электрофорез.

2. Методы обнаружения:

- масс-спектрометрия;
- ядерный магнитный резонанс.

3. Статистические методы.

6 ГЛИКОМИКА

Это систематическое изучение всех гликановых структур клетки или организма (*более 16 млн. структурных единиц*).

Гликаны — полисахариды или олигосахариды, полимеры, состоящие из моносахаридных звеньев, соединенных O-гликозидными связями.

Задачи гликомики - высокоэффективное определение структуры углеводных цепей гликоконъюгатов и изучение функциональных свойств таких белков, как лектины и гликозилтрансферазы, с помощью углеводных зондов.

Методы в гликомике

- Флуоресцентное мечение;
- Тонкослойная хроматография (ТСХ);
- Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ);
- Ионообменная жидкостная хроматография;
- различные варианты электрофореза, включая капиллярный.

Биоинформационные методы для анализа гликановых структур:

- 1) анализ гликозилирования;
- 2) масс-спектральный анализ;
- 3) прогнозирование гликановых маркеров;
- 4) анализ гликановой структуры;
- 5) анализ экспрессии гликогенных генов;
- 6) создание гликановой структуры.

7 ЛИПИДОМИКА

Это наука о липидах, основанная на исследовании идентификации и количественном определении различных клеточных липидов, их взаимодействии с другими метаболитами.

Липиды (от др.-греч. λίπος - жир) - обширная группа природных органических соединений, включающая жиры и жироподобные вещества. Молекулы простых липидов состоят из спирта и жирных кислот, сложных - из спирта, высокомолекулярных жирных кислот и других компонентов. Содержатся во всех живых клетках.

Липидомика

```
graph TD; A[Липидомика] --> B[Тотальный липидом]; A --> C[Медицинская липидомика]; A --> D[Частная липидомика]; A --> E[Пищевая липидомика];
```

**Тотальный
липидом**
(клетки, ткани,
органа, организма)

**Медицинская
липидомика**

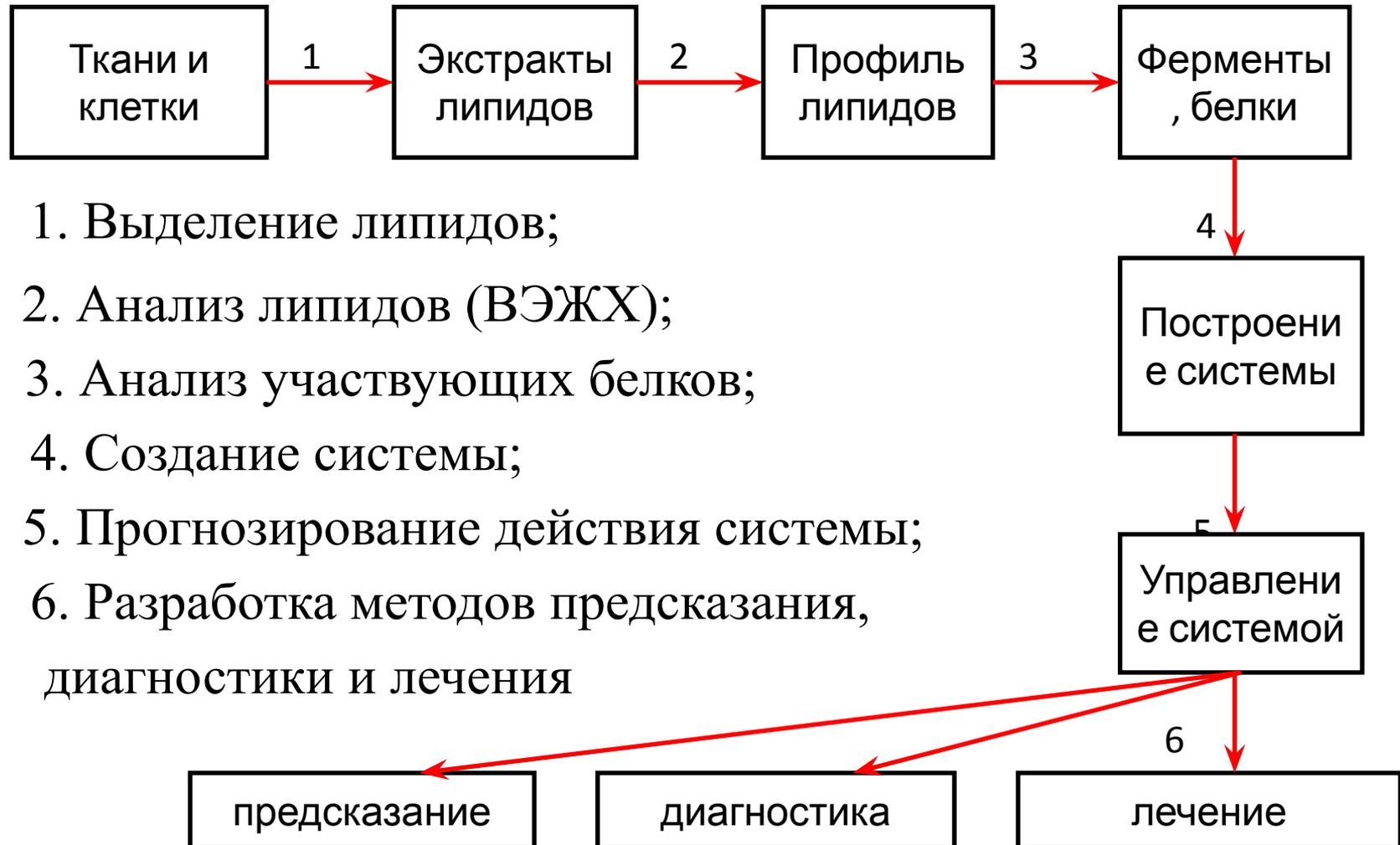
Частная липидомика
(нейролипидомика,
липидомика плазмы крови и т.д.)

**Пищевая
липидомика**

Методы, применяемые для анализа липидов

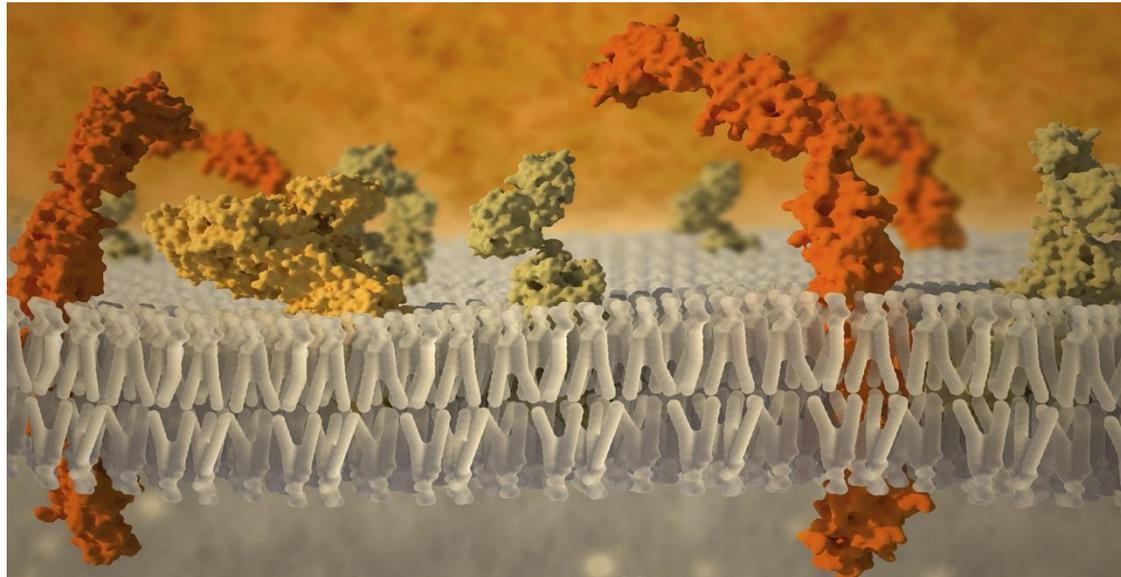
- твердофазная экстракция;
- тонкослойная хроматография (ТСХ);
- ИК-спектроскопия (применяется для определения *транс*-изомеров);
- газожидкостная хроматография (ГЖХ);
- высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ);
- масс-спектроскопия;
- ЯМР-спектроскопия.

Блок-схема поэтапного функционирования ЛИПИДОМИКИ



Применение липидомики:

- идентификация новых липидных молекул;
- использование липидов в качестве биомаркеров (медицинская липидомика);
- выявление регуляторной роли липидов в общей системе регуляции организма, липидной защитной системы.



8 ИНТЕРАКТОМИКА

Это область биоинформатики и системной биологии, идея которой заключается в объединении данных молекулярных взаимодействий на уровнях от метаболома и до регуляции эпигенома в единые схемы.

Цель интерактомики – сравнение сетей взаимодействий (интерактомонов) у различных видов, для того чтобы узнать какие черты таких сетей сохранились или изменились.

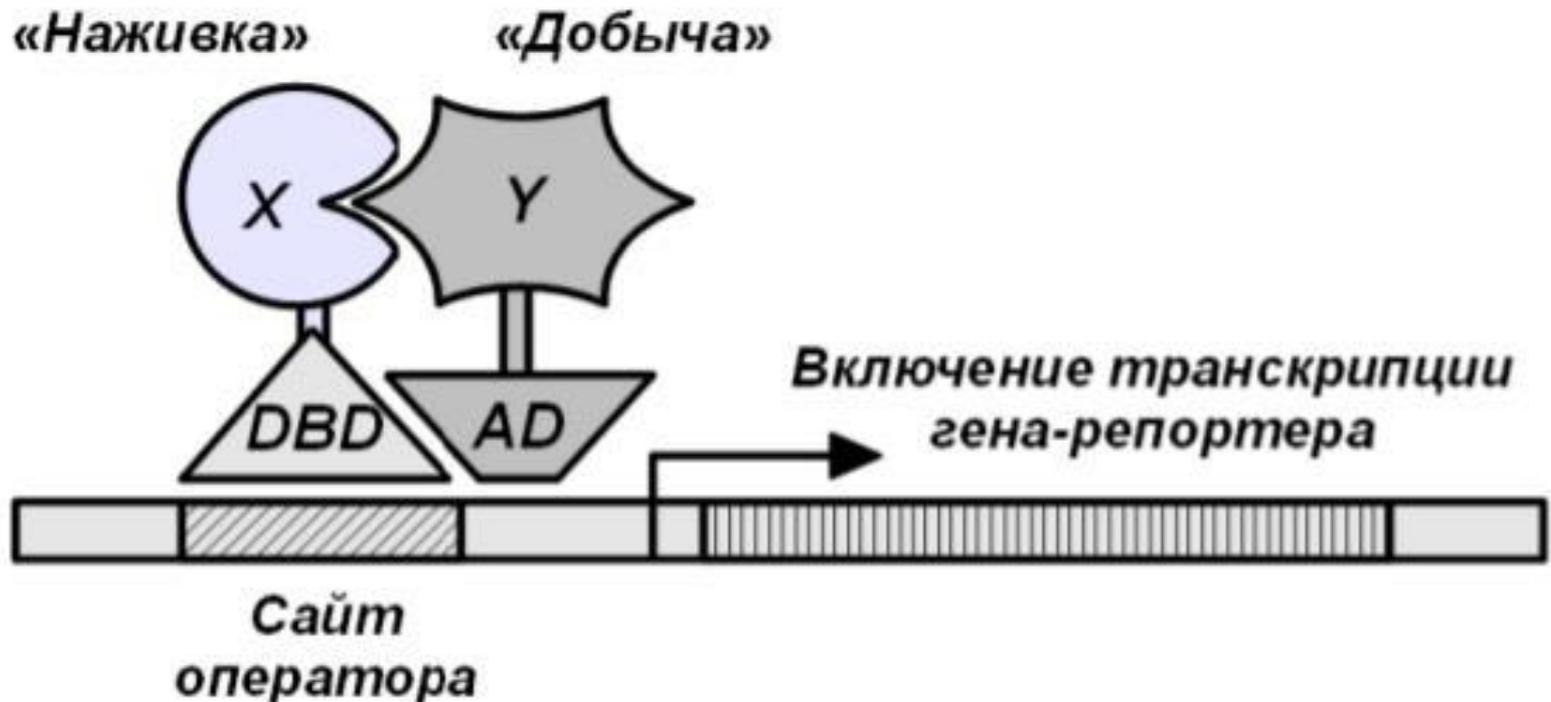
Интерактомика обобщает представления о биосистемах или организмах.

Методы анализа интерактома

- *афинная очистка и последующая масс-спектрометрия*;
- *валидация* - путем сравнения его с уже известными взаимодействиями, которые были найдены и подтверждены независимыми исследованиями;
- *предсказание белок-белковых взаимодействий (ББВ)* - ББВ из одного организма используются для предсказания взаимодействий между гомологичными белками в другом организме («интерологи»);
- *интеллектуальный анализ текста* – получение ББС взаимодействий напрямую из научной литературы;
- *предсказание функции белка* основано на предположении, что неохарактеризованные белки имеют похожие функции, что и белки, взаимодействующие с ними.

Экспериментальные методы создания интерактомоов

Двугибридная дрожжевая система -используется для определения бинарных прямых физических взаимодействий между двумя белками. Метод заключается в анализе взаимодействия белков *in vivo* в дрожжах, путем связывания интересующих белков А и В с разделенными ДНК-связывающим и активационным доменами некоторого активатора транскрипции соответственно.

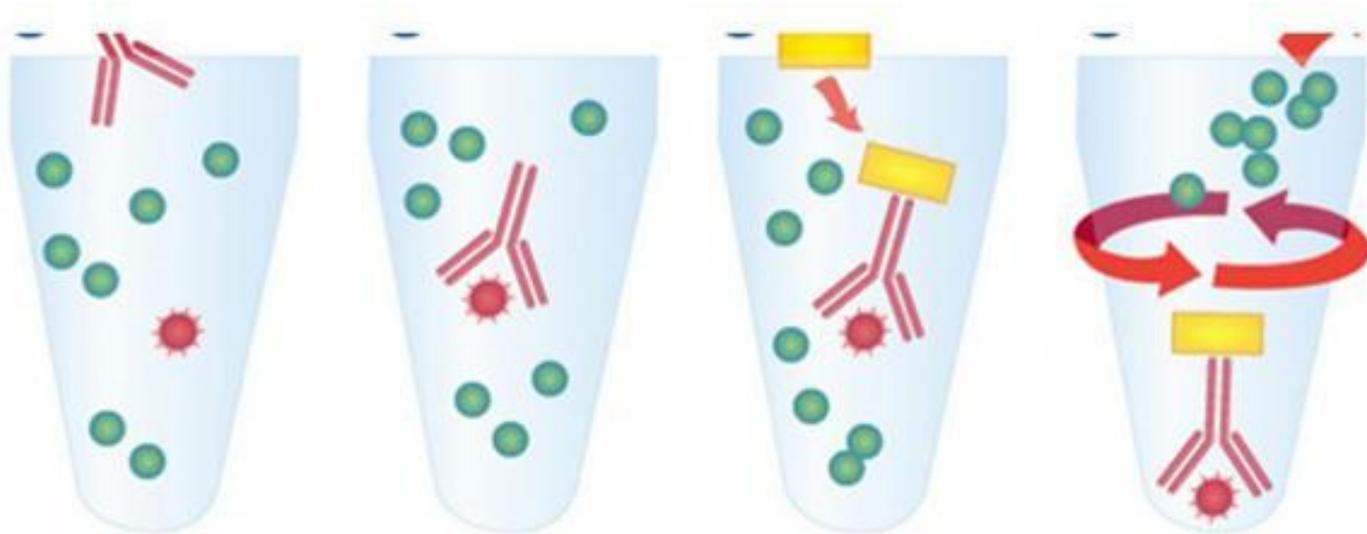


Экспериментальные методы создания интерактомов

Ко-иммунопреципитация - частный случай аффинной хроматографии, позволяющий найти белковые комплексы, из которых можно построить интерактом.

- Сделать лизис клеток при помощи неионного денатуранта;
- Добавить к продукту лизиса специфические антитела, которые связываются с интересующими исследователей белками;
- Удалить не связанные с антителами белки;
- Остаток проанализировать при помощи масс-спектрометрии.

Если связь между белками А и В есть, то при масс-спектрометрии в образец помимо связанного с антителом белка А попадет и связанный с белком А белок В.



9 ИНТЕГРОМИКА

Это суммарный анализ, используемый для персонафицируемой медицины и объединяющий данные о геноме, нуклеотидных последовательностях мРНК, белках, их метаболизме и антителах, обнаруживаемых в организме на протяжении длительного времени (М. Снайдер, 2012 г.).

Интегромика осуществляет процесс статистического комбинирования данных из разных источников для обеспечения единого взгляда на весь геном и крупномасштабного статистического вывода.

Ключевые стадии интеграции данных:

Step 1

- Формулировка проблемы

Step 2

- Определение типов данных (характеристик)

Step 3

- Предварительная обработка данных

Step 4

- Интеграция данных

Step 5

- Интерпретация полученных данных (толкование)

Спасибо
за внимание.

