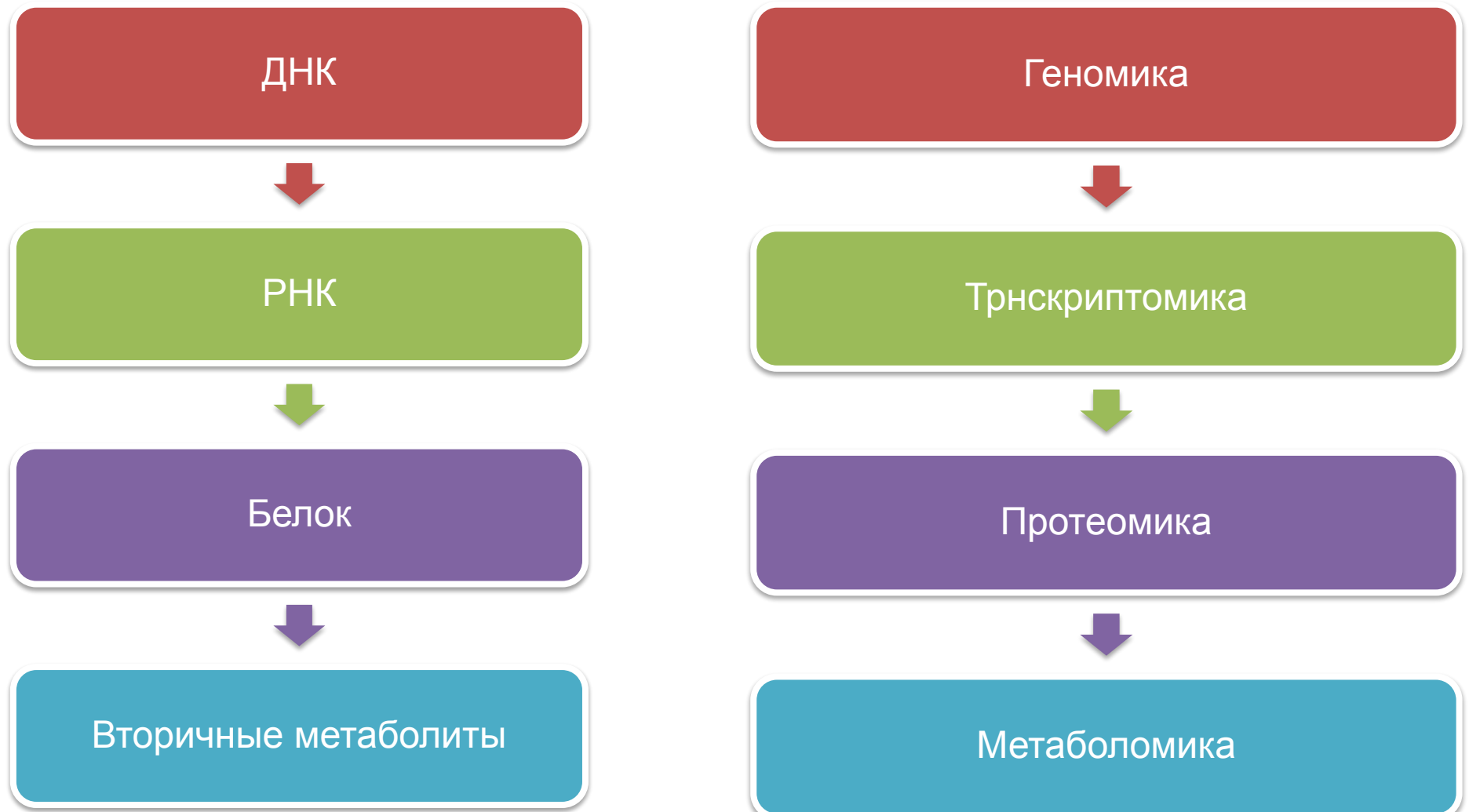


# Протеомика

Методы молекулярной биологии и  
биинформатики в изучении белков

# Парадигма молекулярной биологии

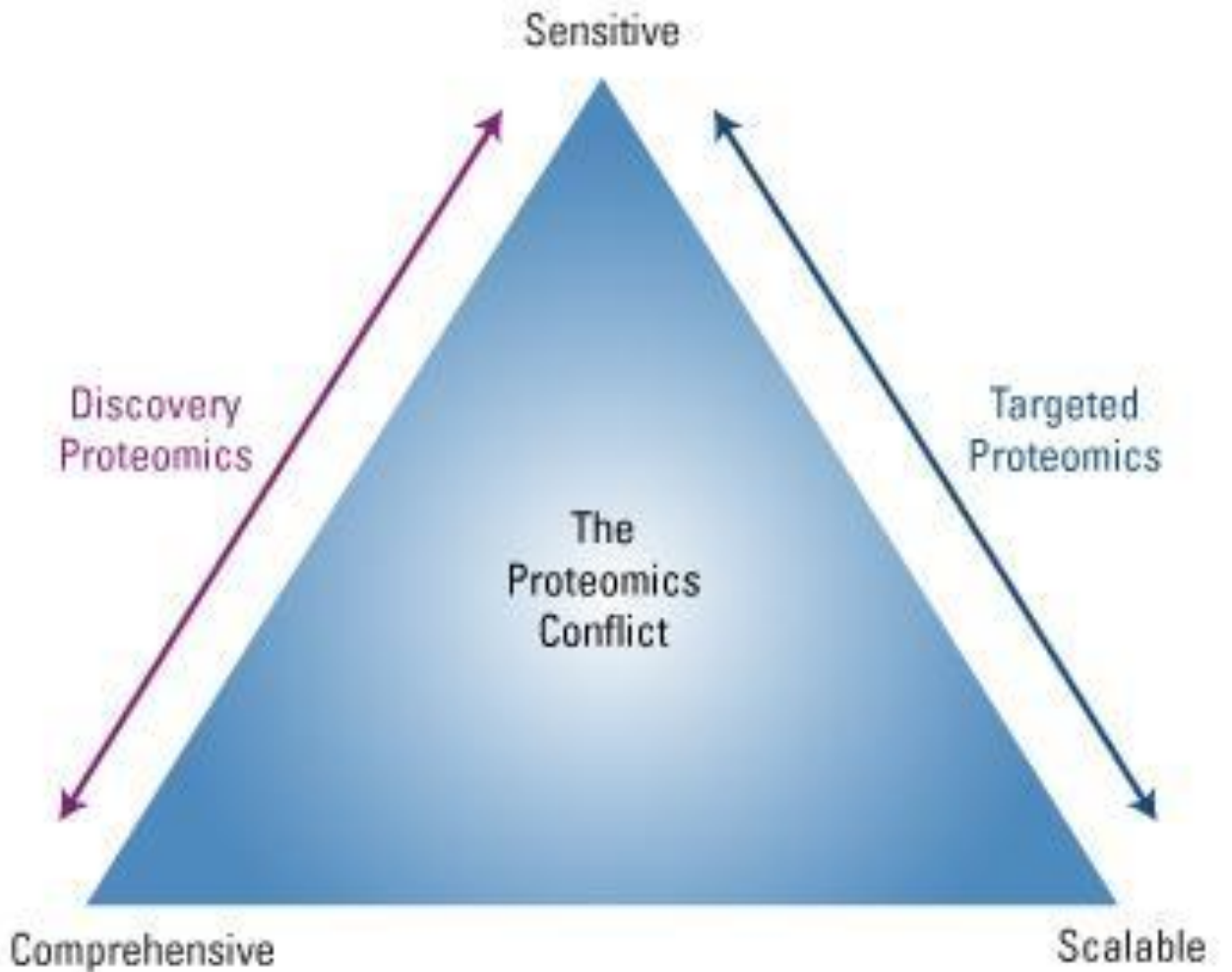


# Протеомика

- 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

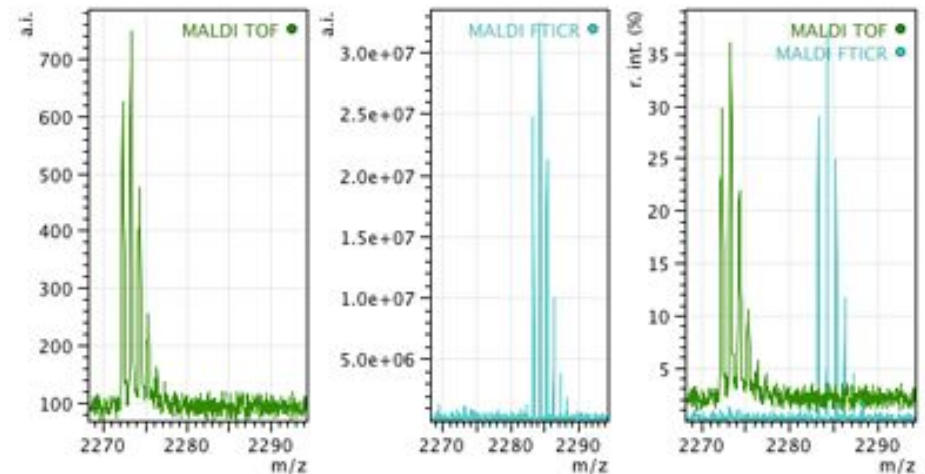
Идентификация белков в Mascot

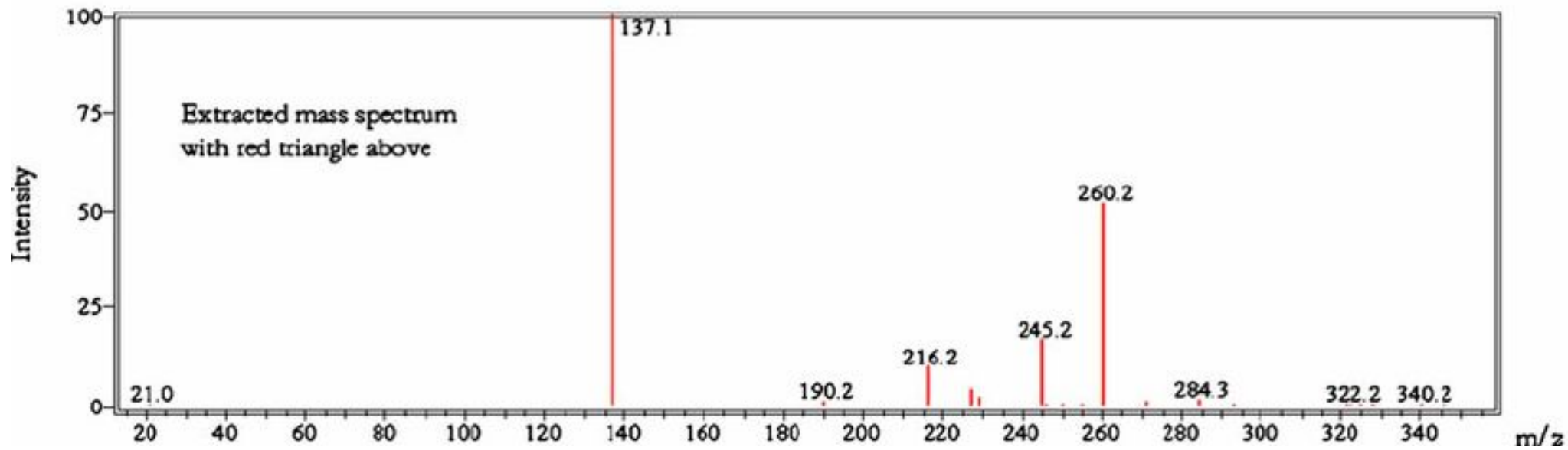
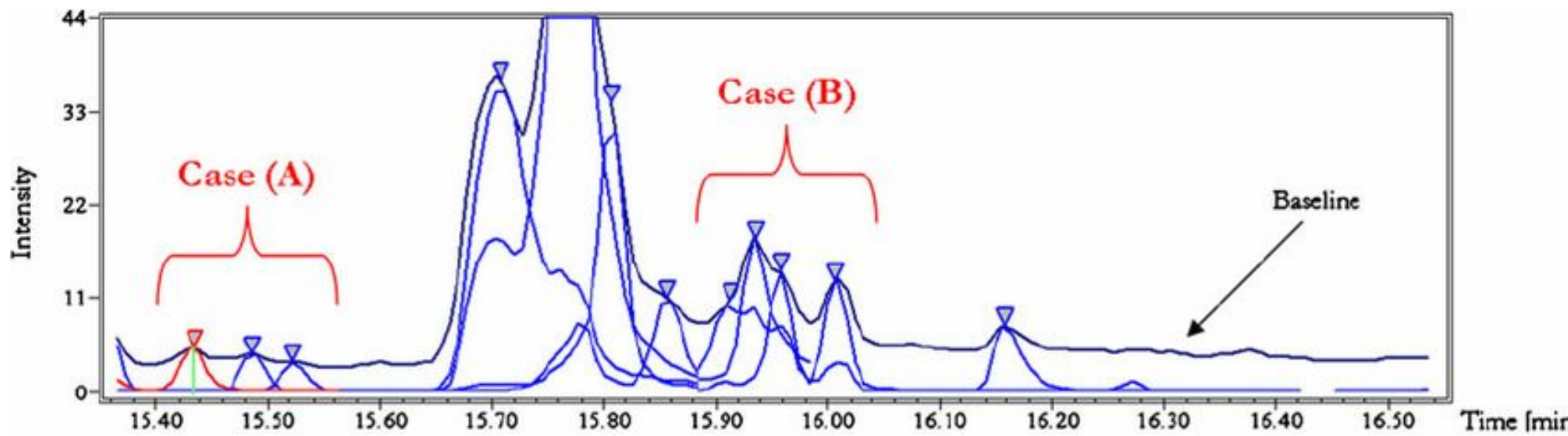
# Масс-спектрометрия в протеомике

- 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

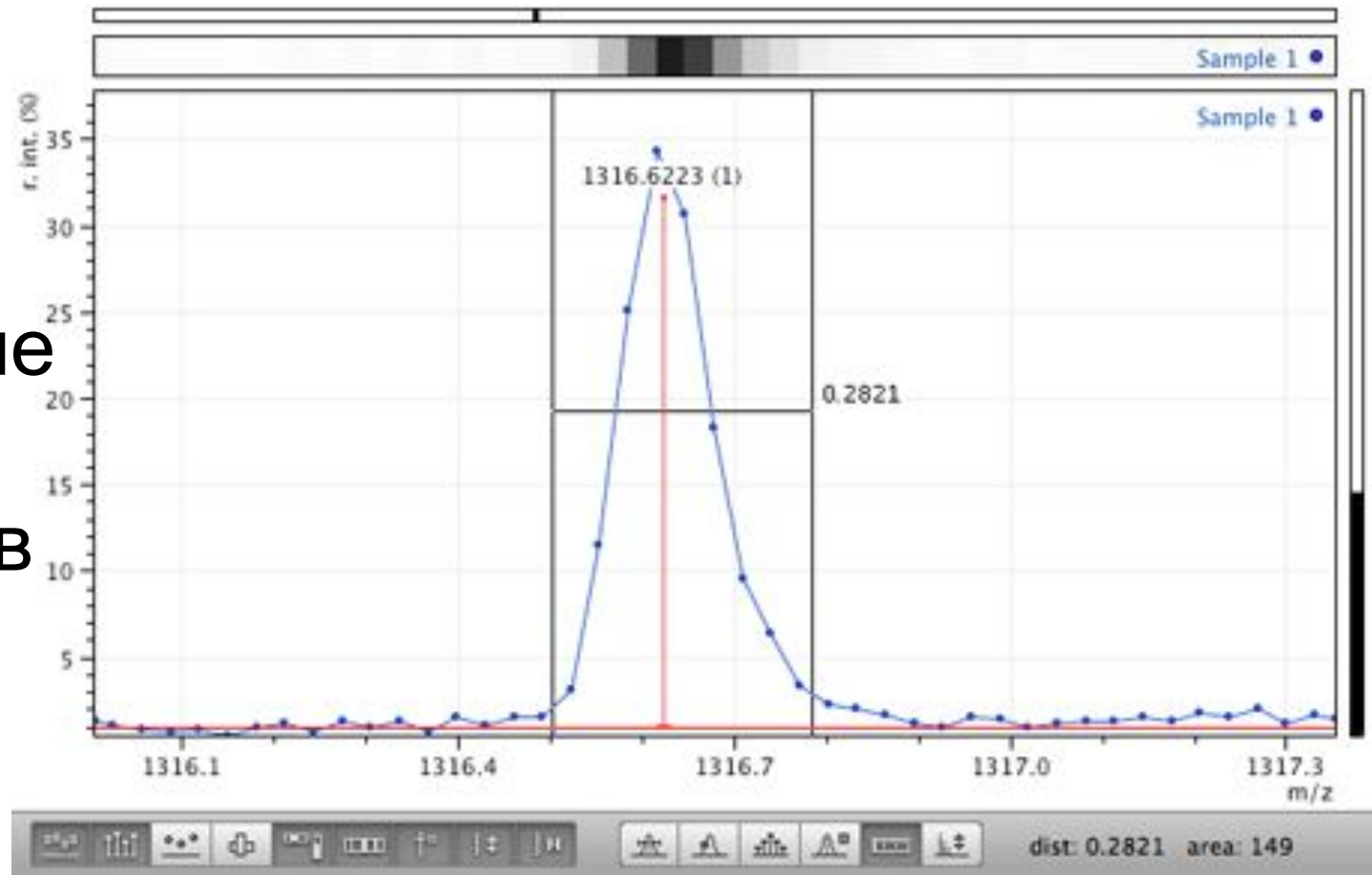
- Оценка предварительных данных (pI, Mw, ...)
- Поиск пиков
- Идентификация пептидов и белков
- Оценка значимости, поиск и объяснение различий





# 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

The screenshot shows the MASCOT Peptide Mass Fingerprint search interface. It includes the following fields and options:

- Your name**: [Text input field]
- Email**: [Text input field]
- Search title**: [Text input field]
- Database(s)**: A dropdown menu with options: Vertebrates\_EST, contaminants, cRAP, NCBIprot, and SwissProt (highlighted).
- Enzyme**: A dropdown menu with the option: Trypsin.
- Allow up to**: A dropdown menu with the option: 1 missed cleavages.
- Taxonomy**: A dropdown menu with the option: All entries.
- Fixed modifications**: A dropdown menu with the option: -- none selected --. Below it is a checkbox for "Display all modifications".
- Variable modifications**: A dropdown menu with the option: -- none selected --. To its right is a list of modification options: 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), and Carbamyl (N-term).
- Protein mass**: [Text input field] kDa.
- Peptide tol. ±**: [Text input field] 1.2 Da.
- Mass values**: Radio buttons for MH<sup>+</sup> (selected), M<sub>r</sub>, and M-H<sup>-</sup>.
- Monoisotopic**: Radio buttons for Monoisotopic and Average (selected).
- Data file**: A "Browse..." button and the text "No file selected."
- Query**: A radio button.
- Data input**: A large text area for entering the query.
- Decoy**: A checkbox.
- Report top**: A dropdown menu with the option: AUTO hits.
- Start Search ...**: A button.
- Reset Form**: A button.

# 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