

С.В. Сучков^{1,2}, Д.А. Гнатенко¹, Д.С. Костюшев¹, С.А. Крынский¹, М.А. Пальцев³

¹ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Российская Федерация

² Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Российская Федерация

³ РНЦ «Курчатовский институт», Москва, Российская Федерация

Протеомика как фундаментальный инструмент доклинического скрининга, верификации анализов и оценки применяемой терапии

Протеомика — наука, изучающая белки живых организмов, их функции и взаимодействие, на сегодняшний день является незаменимым компонентом в создании протоколов доклинической диагностики. В сочетании с достижениями геномики, биоинформатики, использование технологий протеомики — мощный инструмент ранней диагностики заболеваний, а также динамической оценки протекания патологических процессов (в частности, на фоне проводимой фармакотерапии). В статье рассмотрены общие и частные аспекты протеомики, основанные на базе моделей кардио- и онкозаболеваний.

Ключевые слова: протеомика, диагностика, предикция, трансляционная медицина.

65

Введение

Известно, что абсолютное большинство патологических изменений в функционировании клеток, тканей и органов сопровождается отклонением от физиологического белкового профиля нормального здорового организма. В современных условиях анализ и прогнозирование подобных изменений выходят на первый план при создании протоколов доклинического скрининга (т.е. определение скрытых и латентных белковых «предвестников» заболевания, а также оценка эффективности применяемых методов терапии). Поиск, определение, разделение, количественное и качественное определение белковых молекул, играющих роль в обеспечении чувствительности либо непосредственно в формировании заболевания, являются основными задачами протеомики.

Протеомика (англ. *proteomics*) — наука, изучающая белковый состав биологических объектов, а также структурно-функциональные свойства белковых молекул. Ее задачей является идентификация и количественное определение совокупных индивидуальных белков, которые содержатся в биологических образцах (сыворотка крови, спинномозговая жидкость, моча, биоптаты) на разных стадиях развития заболевания, а также на фоне проводимой терапии. Совокупность всех белков организма, т.е., по сути, его белковый профиль, носит название «протеом».

Современный технологический арсенал протеомики

Фракционирование и разделение белков, содержащихся в конкретном биологическом образце, осуществляют

S.V. Suchkov^{1,2}, D.S. Kostushev¹, S.A. Krynskiy¹, D.A. Gnatenko¹, M.A. Paltsev³

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Russian Federation

² A.I. Evdokimov Moscow State Medical Dental University, Russian Federation

³ Kurchatov's Scientific Institute, Moscow, Russian Federation

Proteomics as a fundamental tool for subclinical screening, tests verification and assessment of applied therapy

Proteomics is a science which studies proteins of the body, interactions of proteins and their biological functions. Today, it is an essential partner in establishing preclinical diagnosis protocols. In conjunction with other sciences such as genomics and bioinformatics it will be possible to diagnose diseases on the earliest stages before its clinical onset or to gain the dynamics of pathological processes in the body and response to drug therapy. This article discusses general aspects of proteomics as well as special ones on the basis of models of cardiac diseases and cancer.

Key words: proteomics, diagnostics, prediction, translation medicine.

посредством электрофореза в полиакриламидном геле. Для идентификации же выделенных белков применяют широкую панель методов, среди которых следует выделить:

- микросеквенирование белков;
- жидкостную хроматографию высокого давления (HPLC) и высокого разрешения;
- методы иммунохимического тестирования с использованием моноклональных антител к индивидуальным антигенным детерминантам;
- масс-спектрометрию.

В последние годы процедуру детекции белковых молекул существенно оптимизировали, разработав для этой цели широкую панель микробиочипов с различными типами детекции, например SELDI (surface-enhanced laser desorption/ionization) и/или MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization). Подходы такого рода позволили анализировать одновременно до 10 000 индивидуальных белков в одном образце, фиксируя при этом мельчайшие сдвиги в их концентрациях под влиянием различных факторов. В итоге, если белки различаются хотя бы по одному из присущих им параметров (суммарному заряду молекулы или молекулярной массе), вышеуказанный подход позволяет добиваться их разделения с последующей идентификацией и характеристикой.

66

Одним из наиболее перспективных методов идентификации белков является масс-спектрометрия, основанная на формировании в вакуумном пространстве ионизированных частиц анализируемого вещества с последующим анализом отношения массы ионов к их заряду. Существуют различные модификации масс-спектрометрии, которые подразделяются в зависимости от используемых методов ионизации и детекции частиц. Время-пролетный масс-спектрометр регистрирует отдельные ионы с указанием значения отношения массы к заряду (m/z) иона, числа ионов и времени пролета ионов от источника до детектора ионов [1].

Меньшим разрешением обладают хроматографические методы, позволяющие осуществить разделение белков по физическим свойствам молекул: заряду (ионообменная хроматография), параметрам гидрофобности (гидрофобная хроматография), размеру (гель-фильтрация), способности к связыванию с различными лигандами, например антителами (аффинная хроматография). Речь в этих случаях идет о вариантах жидкостной хроматографии, т.к. в газовой фазе молекулы белка не существуют. В протеомном анализе часто используют комбинацию масс-спектрометрии и жидкостной хроматографии (хромато-масс-спектрометрия): то есть, по сути, создание и внедрение в практику масс-спектрометрии привело к скачку в развитии протеомики.

Наконец, к методам протеомики относится иммунохимический анализ с использованием моноклональных антител к индивидуальным антигенным детерминантам, к линейным и конформационно-зависимым, включая ряд криптопептидов.

Важную роль при работе со срезами тканей играют иммуногистохимические методы исследования, основанные на специфических взаимодействиях антиген-антитело. Иммуногистохимические методы обладают высокой чувствительностью и специфичностью, позволяя определить практически любой интересующий антиген (рамки применения метода ограничиваются только имеющейся в распоряжении библиотекой антител).

Выявление связанных антител осуществляют с помощью ферментных или флуоресцентных меток. В клинической практике более распространены ферментные метки, поскольку метод иммунофлуоресценции, хотя

и является более чувствительным и специфичным, но требует дорогостоящего оборудования. К тому же, флуоресцентные красители имеют короткое время хранения. Некоторые методики включают применение полимерных носителей для антител, что увеличивает чувствительность реакции [2].

Конечным этапом столь трудоемкого и многоступенчатого исследования является идентификация белка при помощи баз данных (биоинформатика).

Биоинформатика с позиции прикладной науки позволяет не только хранить, анализировать и обрабатывать гигантские объемы данных, необходимые для проведения научных и диагностических процедур, но также способна обеспечивать получение информации о функциональных свойствах определенных белковых молекул на основании некоторых данных по структуре генома. Таким образом, не имея практически никакой информации по взаимодействию групп молекул между собой, их функциям и свойствам, в некоторых случаях можно достоверно, с высокой степенью вероятности, определить характеристики изучаемого объекта.

Протеомика как фундамент для научных исследований с последующим внедрением результатов в клиническую практику в рамках принципов и задач трансляционной медицины

В исследованиях нередко необходим анализ большого числа однотипных образцов. Между тем каждое исследование требует материальных и временных затрат, минимизировать которые позволяет метод тканевых матриц, подразумевающий создание библиотек образцов тканей с последующей возможностью одновременного (на одном стекле) исследования множества срезов [2]. Типовая последовательность операций при исследованиях такого рода, такова:

- отбор образца (клетки, ткань, биологическая жидкость);
- приготовление образца (лизис клеток, экстракция белков);
- двумерный электрофорез в полиакриламидном геле;
- проявление белковых пятен на геле;
- анализ электрофореграммы (число пятен, их расположение);
- выделение участков геля, содержащих индивидуальные белковые пятна;
- расщепление индивидуальных белков (трипсинизация) непосредственно в геле;
- масс-спектрометрический анализ (определение аминокислотных последовательностей фрагментов индивидуальных белков);
- идентификация каждого белка и измерение его концентрации, документирование, обработка результатов;
- интерпретация полученных данных с помощью методов биоинформатики — анализ баз данных, получение дифференциального профиля белков.

С помощью такой процедуры уже открыты новые белковые маркеры и получены впечатляющие результаты в области кардиоваскулярной протеомики и онкопротеомики.

Частные аспекты протеомики

Двумя основными разновидностями протеомики являются структурная и функциональная. Первая изучает

структуру индивидуальных белков, в то время как вторая рассматривает их во взаимодействии с другими белками, исследует происходящие при этом конформационные, биохимические и функциональные изменения. Совокупность всех белков клетки, взаимодействующих с конкретной белковой молекулой-мишенью, носит название «интерактом».

Первичным диагностическим целям служит прежде всего структурная протеомика, в то время как функциональная является в большей степени стезей научных исследований, а также фундаментом для разработок принципиально новых лекарственных средств, работающих с конкретными и индивидуальными фармакотерапевтическими мишенями клеточного и молекулярного уровня.

Протеомика плазмы крови

Среди всех тканей организма плазма крови в наибольшей степени отражает белковый состав: протеом плазмы включает около 1/10 всех присутствующих в организме белков. Среди присутствующих в плазме белков выделяют:

- белки, функционирующие в плазме;
- иммуноглобулины;
- гормоны;
- цитокины;
- транзиторно проходящие через плазму белки;
- внутриклеточные белки, попадающие в плазму при разрушении или повышении проницаемости клеток;
- белки, отсутствующие в норме и секретируемые малигнизированными клетками;
- чужеродные белки [3].

Не меньше 1/2 белков плазмы существует в виде мультипротеиновых комплексов. С помощью особых молекулярных меток, вводимых в молекулу белка, возможны выделение и изоляция таких комплексов в целях их дальнейшего исследования на предмет особенностей конкретного интерактома.

К настоящему времени идентифицировано более 10 000 белков плазмы на основе масс-спектрометрического анализа одного или двух пептидов каждого белка и более 3000 белков — при идентификации двух и более пептидов. Почти 900 белков плазмы идентифицированы с достоверностью 95%.

Возможности, открываемые протеомным анализом плазмы крови, весьма заманчивы. Однако плазма как типовой тест-образец имеет и ряд существенных недостатков. К таковым относится очень большой (до 10 порядков) разброс концентраций белков и преобладание среди них диагностически мало значимых. При изучении изменений протеома плазмы, например при сердечно-сосудистой патологии, сначала нужно найти способ отделить эти незначимые белки, что представляет значительную трудность. Следовательно, оптимальным по чувствительности и специфичности будет исследование образца, полученного при биопсии органа-мишени, что, однако, не всегда применимо.

Следует отметить, что, несмотря на интенсивные исследования в данной области, темпы внедрения новых биомаркеров в клиническую практику остаются низкими [4]. Это объясняется как объективными, так и субъективными причинами. Одной из них следует считать преимущественно эмпирический подход к организации исследований без их должного теоретического обоснования, а также недостаточное развитие инфраструктурных связей между исследовательскими центрами, отсутствие унифицированной номенклатуры и проблемы с систематизацией имеющихся данных. Фактические данные в немалой

мере остаются разрозненными, поскольку темпы их накопления опережают возможности науки к их интеграции.

Кардиоваскулярная протеомика

Этот раздел протеомики относится к развивающимся наиболее интенсивно. Уже созданы базы данных по сотням белков протеома миокарда, уровни которых изменяются при хронических и острых сердечно-сосудистых патологиях. Наибольшие успехи достигнуты в изучении дилатационной кардиомиопатии. При этом заболевании изменяется содержание более 100 белков, которые можно разделить на 3 основные группы:

- белки, связанные с энергией и метаболизмом;
- белки, индуцируемые стрессом;
- белки, обеспечивающие контрактильные функции и формирование цитоскелета.

Такие результаты вполне соответствуют современным представлениям о патогенезе дилатационной кардиомиопатии.

Не столь значительны успехи в изучении патогенеза ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности. Не всегда имеется возможность адекватно моделировать приведенные виды патологии: некоторые результаты, получаемые на животных моделях, не согласуются с таковыми на человеке. Большая часть достоверных результатов связана с ролью в развитии и предотвращении ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности т.н. белков теплового шока (Hsp 27) [5]. Особое внимание уделяют изучению протеома при реперфузионном синдроме. После реперфузионной травмы обнаруживают изменения структуры сократительных белков: MLC-2 (легкая цепь миозина 2), всех трех белков тропонинового комплекса. Исследуют сигнальные механизмы, задействованные в патогенезе реперфузионного синдрома, хотя целостная картина белковых взаимодействий до конца все еще не установлена. Проводились исследования по изучению феномена дистантного прекодиционирования миокарда перед ишемической травмой, когда гипоксическое состояние создает сначала в каком-либо ином органе, а затем в сердце. При этом уменьшается реперфузионное повреждение. Однако до настоящего времени выявить кандидатные молекулы на роль гуморальных медиаторов прекодиционирования не удалось.

Изучение протеомики атеросклероза затруднено вследствие значительной функциональной гетерогенности фенотипа эндотелиальной ткани. Тем не менее, получены модели белкового профиля атеросклеротических бляшек, в которых обнаруживают изменения содержания таких белков, как Hsp27, кристаллинов, фактора некроза опухоли α , катепсинов, пероксиредоксинов и др., всего около 80 белков [5]. Для создания биомаркеров атеросклероза предлагается исследовать профили белков плазмы, связанных с воспалением. Также изучается секреция белков атеросклеротическими бляшками *in vitro*.

При хронической сердечной недостаточности единственным клинически приемлемым биомаркером является В-натрийуретический пептид. Что касается ишемической болезни сердца, то здесь число биомаркеров значительно больше: сердечные тропонины, креатинкиназа и др. Однако их содержание повышается лишь на поздних стадиях ишемии, поэтому ведется поиск новых биомаркеров, позволяющих диагностировать ее ранние стадии. Другая область интересов — биомаркеры, специфичные именно для ишемии (а не некроза миокарда). На данный момент существует только один такой маркер — модифицированный ишемией альбумин (ischemic-

modified albumin, IMA). Тем не менее, невысокая специфичность затрудняет его использование вне комплекса с традиционными биомаркерами.

Исследование протеома сердца сопряжено со значительными трудностями. Наиболее точным методом анализа могла бы стать биопсия, но она трудновыполнима. В случае же исследования плазмы крови выделение среди огромной массы белков тех, которые могли бы иметь клиническое значение, представляет собой чрезвычайно непростую задачу. В связи с этим в исследованиях на животных нередко используют перфузию изолированных сердец кровезамещающими растворами с последующим исследованием выделенных тканями в раствор белков. Другим направлением является исследование перикардиальной жидкости. Так, у пациентов, которым проводилось кардиохирургическое вмешательство, исследовали уровень в перикардиальной жидкости белка H-FABP (белок, связывающий жирные кислоты, сердечный тип). Было обнаружено, что при ишемии уровень этого отсутствующего в плазме крови белка перикардиальной жидкости повышается [6].

Протеомика заболеваний легких

При исследованиях заболеваний легких, с точки зрения протеомики, в качестве образцов используют легочную ткань, жидкость, выстилающую эпителий, альвеоциты, плазму крови.

Для изучения протеома жидкости, выстилающей эпителий, в качестве образца применяют бронхоальвеолярную жидкость. Некоторые специфичные для легочной ткани белки, такие как глутатион-S-трансфераза и белок сурфактанта В, представлены в этой жидкости значительно больше, чем в плазме. Исследуют изменения бронхоальвеолярной жидкости при различных заболеваниях: саркоидозе, муковисцидозе, мезотелиоме, идиопатическом фиброзирующем альвеолите и др. Исследование бронхоальвеолярной жидкости также позволяет выделять альвеолярные макрофаги для последующей оценки их протеомного профиля [7].

Для получения образцов легочной ткани необходимо использование инвазивных технологий. Эти исследования в основном направлены на оценку изменений протеома при раке легкого. В исследовании D.P. Carbone [8] обнаружено, что содержание белков SUMO-2 (малый убиквитиноподобный белок-2), тимозина-β4 и убиквитина коррелирует с прогнозом при немелкоклеточном раке легкого. Проводились исследования для определения белковых паттернов, отличающих инвазивные опухоли от нормального эпителия бронхов [9, 10]. Для повышения достоверности результатов при получении образцов использовали лазерную микродиссекцию с целью предотвращения захвата здоровых тканей. Тем не менее, прежде чем станет возможным внедрение новых биомаркеров в клиническую практику, потребуются длительные клинические испытания.

Для построения протеомных профилей аденокарцином также применяют исследование плазмы крови. Так, при мечении радиоактивным кислородом было обнаружено 211 белков, уровень которых при аденокарциноме легкого у мышей повышался, и 246 белков, содержание которых снижалось.

Онкопротеомика

Основные задачи онкопротеомики таковы:

- построение протеомов и анализ их динамики при возникновении и развитии различных опухолей;

- идентификация путей передачи клеточных сигналов, приводящих к онкогенезу;
- идентификация маркеров для диагностики онкологических заболеваний и для мониторинга ответа опухоли и организма на хирургическое вмешательство и на разные типы терапии;
- определение иммунного ответа на онкогенез.

Онкомаркеры — макромолекулы (обычно белки с липидным или углеводным компонентом), наличие и концентрации которых в плазме крови и/или другой биологической жидкости коррелируют в определенной степени с наличием и ростом злокачественной опухоли. Среди большого разнообразия показателей, используемых в диагностике опухолей, есть как специфические онкомаркеры, так и некоторые вещества, концентрация которых может меняться при различных патологических процессах, в т.ч. и опухолевых. К наиболее специфичным онкомаркерам, практически отсутствующим в здоровом организме, относятся эмбриональные антигены (синтез которых прекращается на ранних стадиях эмбрионального развития и дерепрессируется при злокачественной трансформации): раковый эмбриональный антиген, α-фетопропротеин. Опухоль-специфические антигены — молекулы (секреторные продукты или мембранные гликопротеины), экспрессируемые опухолевыми клетками более интенсивно, чем нормальными. К ним относятся СА 19-9, СА 15-3 (мембранные гликопротеины), а также простат-специфический антиген (ПСА) — секреторный продукт glanduloцитов простаты. Кроме того, в качестве онкомаркеров могут выступать гормоны (хорионический гонадотропин) и вещества других групп (тиреоглобулин, β₂-микроглобулин и др.) [11]. Для прогнозирования течения заболевания исследуют белки-маркеры пролиферативной активности и белки-регуляторы апоптоза (рис. 1).

Области клинического применения онкомаркеров следующие:

- ранняя диагностика онкологических заболеваний;
- мониторинг и оценка эффективности лечения;
- определение прогноза.

Исходя из вышесказанного, основными требованиями к онкомаркеру являются достаточно высокая чувствительность и специфичность, корреляция с объемом опухоли, способность давать информацию о локализации опухоли.

Чувствительность и специфичность большинства доступных в настоящее время опухолевых биомаркеров часто оказывается недостаточной. Клинически пригодными считают маркеры, для которых чувствительность при специфичности 95% составляет более 50%, и лишь немногие из них при указанном уровне специфичности способны демонстрировать чувствительность более 70%. Существует 2 подхода к поиску новых онкомаркеров: первый предполагает направленные исследования на основе современных знаний о канцерогенезе, проверку определенных гипотез; второй — эмпирический поиск путем сравнения протеомов нормальных и опухолевых клеток либо путем сравнения белкового профиля сывороток здоровых и больных пациентов, пациентов; имеющих и не имеющих факторы риска.

Рассмотрим возможности применения современных онкомаркеров в 3 указанных выше аспектах.

1. Диагностика. Ввиду недостаточной чувствительности большинство онкомаркеров непригодно для скрининговых исследований в общей популяции. Однако некоторые из них могут эффективно применяться для ранней диагностики в группах риска, где вероятность заболевания изначально выше. Так, скрининг на ПСА

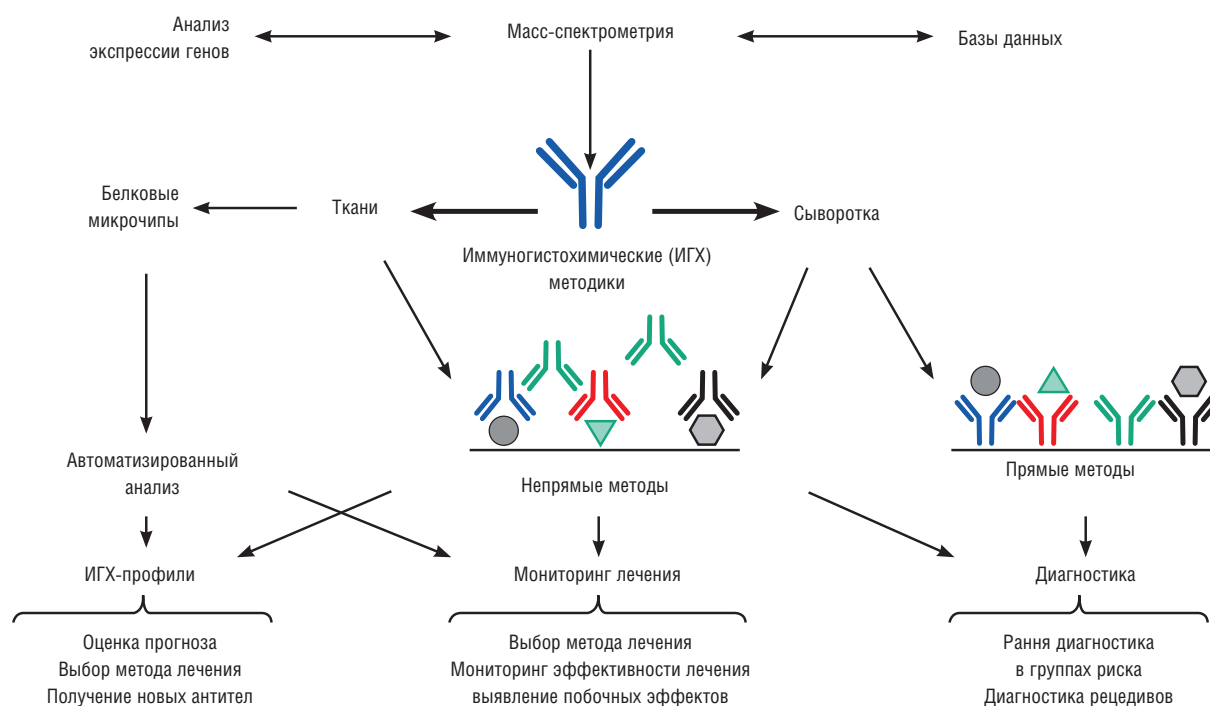


Рис. Технологии протеомики в диагностике онкологических заболеваний.

осуществляют в группе мужчин старше 50 лет; скрининг на α -фетопротеин (маркер гепатоцеллюлярной карциномы) — у больных циррозом печени; на кальцитонин (маркер медуллярного рака щитовидной железы) — у лиц с отягощенным наследственным анамнезом.

2. Мониторинг течения заболевания. В настоящее время именно для этих целей онкомаркеры применяют наиболее широко. Признаком успешной радикальной операции является стойкое снижение концентрации маркера. Последующее ее повышение свидетельствует, в зависимости от времени и скорости нарастания, о наличии резидуальной опухоли, возникновении рецидива или отдаленном метастазировании.

3. Прогнозирование течения заболевания и определение лечебной тактики. Уровень многих онкомаркеров коррелирует с объемом первичной опухоли и резко возрастает при местном и отдаленном метастазировании. Так, к примеру, при хроническом лимфолейкозе содержание маркера сывороточной дезокситимидинсинтетазы коррелирует с вариантом течения заболевания (стабильным или прогрессирующим) [11].

Для прогнозирования течения заболевания определяют также экспрессию маркеров пролиферативной активности: белка Ki-67, PCNA, циклинов (например, циклина D1), ингибиторов циклин-зависимых киназ. Большое прогностическое значение имеют уровни белков-регуляторов апоптоза (Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak и др.) [1]. В последнее время интенсивно исследуют ингибиторы апоптоза — серивин, теломеразу. Повышение концентрации этих молекул было продемонстрировано для опухолей многих, хотя и не всех локализаций. При этом уровень их экспрессии коррелирует со стадией развития опухоли. Для карцином некоторых типов доказана корреляция течения с уровнем экспрессии белка p53, а также числом мутантных форм этого белка [12].

Тип исследуемого маркера и значимость результата варьируют в зависимости от гистологического строения и локализации опухоли. Окончательное заключение выносится после комплексной оценки с другими факторами. Важной задачей онкологии является идентификация сигнальных путей, вовлеченных в процесс канцерогенеза. Несомненна роль в этом процессе белков-регуляторов апоптоза: p53, белков семейства bcl и др. [1]. В фокусе функциональной протеомики находится изучение интерактомо указанных белков, иными словами — реконструкция молекулярных взаимодействий, в которые эти белки вовлечены.

Основная проблема во внедрении онкопротеомики в практику состоит в сложности обучения онкологов чтению карт онкотранскриптомов и онкопротеомов.

Виды белковых молекул и особенности интерактомо

Хотя многие белки осуществляют свои функции независимо, подавляющее большинство из них требует высокоспецифичных взаимодействий с другими белками организма для проявления своей биологической активности. Примеры различных белок-белковых взаимодействий, встречающихся в сложных биологических системах:

- белок-белковые интерактомы в строго определенных клеточных компартаментах;
- белки-мессенджеры, взаимодействующие с рецепторами на внешней поверхности клеточной мембраны, что является необходимым условием для запуска сигнальных каскадов;
- белки, формирующие сетевые и структурные взаимодействия, структурные взаимосвязи на межклеточном уровне;
- ингибиторы ферментов;

- модификация (часто с последующей денатурацией) в результате действия ферментов;
- взаимодействия белковых субъединиц, приводящих к аллостерическим эффектам в составе мультимерных биоккомплексов;
- белок-белковые взаимодействия, лежащие в основе двигательных функций отдельных органелл, органов или организма в целом (мышечное сокращение).

Белковые взаимодействия обычно подразделяют на стабильные и транзиторные, причем оба типа могут обеспечиваться как сильными, так и слабыми межмолекулярными связями [13].

Стабильное взаимодействие наблюдается в белках, состоящих из нескольких субъединиц-комплексов, полипептидных цепей. Типичным примером комплексных белковых молекул, состоящих из нескольких стабильно связанных полипептидных цепей, могут служить гемоглобин и полимераза.

Транзиторные белок-белковые взаимодействия участвуют в контроле большинства внутри- и внеклеточных сигнальных процессов. Транзиторные взаимодействия обычно требуют определенного набора условий, который способствует развитию различных физиологических эффектов, а именно: фосфорилирования, конформационных изменений или локализации на дискретной области клетки. Временно взаимодействующие белки вовлечены в широкий спектр клеточных процессов, в т.ч. в каталитическую модификацию белка, транспортную, резервную, сигнальную, регуляторную, рецепторную и моторную функции.

Транзиторное белок-белковое взаимодействие наблюдается и при транспорте белков через поры мембраны, при деформации нативных белков, на отдельных этапах цикла трансляции, перестроении клеточных структур в ходе клеточного цикла (цитоплазматические микрофиламенты, комплекс ядерных пор и др.) [14].

Белки могут связываться друг с другом с помощью гидрофобных/гидрофильных связей, Ван-дер-ваальсовых сил, ионных мостов между связывающими доменами на каждом белке. Эти домены могут быть представлены небольшим участком поверхности белка и состоять всего лишь из нескольких пептидов. С другой стороны, широко распространены белки с длинными полипептидными участками, охватывающими сотни аминокислот; прочность их связывания зависит от размера и свойств связывающего домена. Одной из самых распространенных внутрибелковых связей, обеспечивающей стабильность всей молекулы, является лейциновая «застежка-молния».

В лейциновой «застежке» аминокислота лейцин находится приблизительно в каждом 8-м положении α -спирали, в результате чего лейциновые остатки оказываются на одной ее стороне, образуя амфипатическую спираль, в которой одна сторона обладает гидрофобными свойствами. Таким образом, лейциновая «застежка» образует димерный белок благодаря связыванию двух параллельных α -спиралей подобно застежке-молнии.

Два Src-гомологических (SH) домена, SH2 и SH3, являются примером временного связывания доменов, которые соединяются короткими пептидными последовательностями и обычно встречаются в сигнальных белках. SH2-домен «признает» только пептидные последовательности с фосфорилированными остатками тирозина, что является признаком активированного белка. Другими словами, область SH2 — наиболее важная на рецепторе, участвующем в сигнальном пути фактора роста, в котором с помощью лиганд-рецептор-опосредованного фосфорилирования остатков тирозина с помощью SH2-доменов распознаются эти остатки. SH3-домены обычно распознают богатые пролином последовательности пептидов и, как правило, встречаются в таких ферментах, как киназы, фосфолипазы и ГТФазы. Они предназначены для выявления целевых белков [15].

Заключение

Протеомика, будучи наукой фундаментальной, тем не менее, незаменима при решении ряда практических медицинских и прикладных научных задач. Исследование различных биологических жидкостей организма с применением современных технологических приемов протеомики может предоставить врачу-диагносту достаточные объемы информации, необходимые для однозначной постановки диагноза либо оценки рисков определенного заболевания у конкретного пациента. Построение алгоритмов доклинического и клинического мониторинга больных с использованием конгломератов лабораторно-диагностических процедур, включающих геномные, транскриптомные и протеомные методы анализа, а также биоинформационные приемы обработки и анализа данных, является залогом успешного выявления патологического состояния в стадии скрытого течения, верификации диагноза, определения и возможной предикции типа и характера течения болезни, а также мониторинга реакций организма пациента в ответ на применяемый вид терапии.

REFERENCES

1. Alaoui-Jamali M.A., Xu Y.J. Proteomic technology for biomarker profiling in cancer: an update. *J. Zhejiang. Univ. Sci. B.* 2006; 6: 411–420.
2. *Vvedenie v molekulyarnuyu diagnostiku* [Introduction to molecular diagnostics]. Pod red. M.S. Pal'tseva [M.S. Pal'tsev (editor)]. Moscow. *Meditina.* 2010. 368 p.
3. Anderson N.L., Anderson N.G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell Proteomics.* 2002; 11: 845–867.
4. Sturgeon C. Perspectives in clinical proteomics conference: translating clinical proteomics into clinical practice. *Exp. Rev. Proteomics.* 2010; 4: 469–471.
5. McGregor E., Dunn M.J. Proteomics of heart disease. *Hum. Mol. Genet.* 2003; 2: 135–144.
6. Edwards A.V., White M.Y., Cordwell S.J. The role of proteomics in clinical cardiovascular biomarker discovery. *Mol. Cell Proteomics.* 2008; 10: 1824–1837.
7. Bowler R.P., Ellison M.C., Reisdorph N. Proteomics in pulmonary medicine. *Chest.* 2006; 2: 567–574.
8. David P. Carbone, Harvey I. Pass, David H. Johnson. Principles and Practice of Lung Cancer: The Official Reference Text of the IASLC. ISBN 0781773652, 9780781773652.
9. Lemon W.J. et al. Identification of candidate lung cancer susceptibility genes in mouse using oligonucleotide arrays. *J. Med. Genet.* 2002; 39: 644–655.
10. Gu Y.M. Elevated thymosin beta15 expression is associated with progression and metastasis of non-small cell lung cancer. *APMIS.* 2008 Jun; 116 (6): 484–90.

11. Fatekh-Mogdakh A., Stiebler P. Rational use of tumor markers. *Roche Diagnostics*. 2002. 114 p.
12. Brennan D.J., O'Connor D.P., Rexhepaj E., Ponten F. Antibody-based proteomics: fast-tracking molecular diagnostics in oncology. *Nat. Rev. Cancer*. 2010; 9: 605–617.
13. Golemis E. Protein-protein interactions: A molecular cloning manual. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1x. 2002. 682 p.
14. Phizicky E.M., Fields S. Protein-protein interactions: Methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* 1995; 59: 94–123.
15. Berggard T., Linse S., James P. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics*. 2007; 16: 2833–2842.

FOR CORRESPONDENCE

Suchkov Sergei Viktorovich, PhD, Professor of Department of A.I. Evdokimov Clinical Immunology, Professor of Department of Pathology I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

Address: 101000, Moscow, Miasnitskaya St., 20; **tel.:** (495) 771-32-32; **fax:** (495) 708-31-56; **e-mail:** ssuchkov57@gmail.com

Kostyushev Dmitry Sergeevich, Intern Researcher of Department of Pathology I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

Address: 119991, Moscow, Trubetskaya St., 8/2; **tel.:** (425) 037-08-54; **e-mail:** dkostushev@gmail.com

Krynsky Sergei Andreyevich, First Moscow State Medical University Student

Address: 119991, Moscow, Trubetskaya St., 8/2; **tel.:** (425) 037-08-54; **e-mail:** dkostushev@gmail.com

Gnatenko Dmitry Aleksandrovich, Intern Researcher of Department of Pathology I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

Address: 119991, Moscow, Trubetskaya St., 8/2; **e-mail:** gnatenkodmitrij@gmail.com

Pal'tsev Michael Aleksandrovich, PhD, the Academician of the Russian Academy of Medical Sciences, Professor, Deputy Director for Science of Research Center «Kurchatov Institute»

Address: 123182, Moscow, Academician Kurchatov Square, 1; **tel.:** (499) 196-95-39; **fax:** (499) 196-17-04;

e-mail: paltsev_ma@rrcki.ru