

РЕДАКЦИОННЫЕ КОММЕНТАРИИ

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОТЕОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ. ВЫЖИВУТ ЛИ УНИВЕРСИТЕТСКАЯ И АКАДЕМИЧЕСКАЯ НАУКИ В КОНКУРЕНЦИИ С ФИРМАМИ?

А.И.АРЧАКОВ

НИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, РАМН,
Погодинская ул., 10, 119992, Москва

Завершается организационный период нового биомедицинского научного протеомного сообщества - HUPO (Human Proteome Organisation). 25 июня 2001 года избран первый президент этой организации - профессор Sam Hanash. Это один из ведущих ученых в области раковой протеомики. Он является профессором медицины в Мичиганском университете. Профессор Hanash внес большой вклад в различные аспекты протеомики (от технологических разработок, создания информационных баз данных и интеграции геномных и протеомных исследований до клинического применения протеомики). Он возглавляет крупную научно-исследовательскую группу, которая сосредоточила все свое внимание на применении протеомики в классификации онкологических заболеваний, на обнаружении новых терапевтических целей и новых биомаркеров для ранней диагностики рака.

Одним из приоритетных направлений деятельности HUPO является эффективная мобилизация ресурсов частного, научного и правительственного сектора, которая способствовала бы решению основных задач, стоящих перед протеомикой.

В ближайшем будущем будет созвано совещание с целью регистрации HUPO в качестве корпорации и установления основных принципов её будущей деятельности. Вторая ежегодная встреча участников Проекта «Протеом человека» намечена на начало 2002 года.

На сегодняшний день деятельность HUPO привлекает интерес как со стороны отдельных лиц, так и компаний, предлагающих свою поддержку. На сегодняшний день финансовые возможности организации, по оценке Совета HUPO, составляют более 1 млрд. долларов. В дальнейшем эта сумма увеличится за счет финансирования многочисленных других групп, поддерживаемых правительством в секторе функциональной геномики и широко распространенных в Европе, Юго-восточной Азии, Австралии и США. Так что, в принципе,

координированная работа по проекту «Протеом человека» уже может быть начата. Однако первоначальная роль проекта будет, несомненно, связана с определением приоритетных задач. По итогам Вашингтонской встречи, состоявшейся в апреле этого года, немечены следующие задачи:

1. Создание каталога белков человека: полный список всех белков, включая ко- и посттрансляционно модифицированные продукты, варианты множественного сплайсинга и характеристики семейств белковых изоформ, кодируемых одним геном. Это позволит соотнести рассчитанную последовательность генома человека с открытыми рамками считывания, стартовыми кодонами, границами экзонов/интронов с экспериментальными данными.

2. Сделать доступным клон кДНК, который позволит производить рекомбинантные белки с каждой открытой рамки считывания.

3. Производить «репортерные» лиганды для каждого продукта открытой рамки считывания. Такое производство может включать традиционные антитела, антителомиметики, фаговое представление антител или отдельных фрагментов, аптомеры, аффитела и другие лиганды.

4. Детальный анализ белок/белковых взаимодействий.

5. Детальный анализ взаимодействий белков с нуклеиновыми кислотами.

6. Установление более тесных связей с геномным структурным сообществом.

7. Детальный анализ всех уровней тканеспецифичной экспрессии белков.

8. Детальный анализ всех уровней внутриклеточной экспрессии белка.

9. Статус каждого из восьми пунктов в отношении многочисленных заболеваний.

Другие инициативы также должны включать доступ к централизованным банкам здоровых и патологически измененных тканей и установление международных стандартов для производства и сравнения результатов исследований.

Все эти задачи рассматриваются в качестве неотъемлемых составляющих проекта «Протеом человека».

Предполагается, что по своему масштабу проект «Протеом человека» будет гораздо мощнее своего «геномного собрата», но по своей природе протеомный проект будет намного демократичнее, о чем свидетельствуют многочисленные свободные ниши внутри самой организации. Ожидается, что многочисленные группы во всем мире внесут существенный вклад в развитие широкомасштабных частных и общественных инициатив, а также небольших специализированных лабораторий.

Большой интерес коммерческих фирм к протеомным исследованиям наглядно продемонстрировал и состоявшийся в сентябре этого года в Мюнхене белковый форум.

В 80 устных докладах и в более чем 150 постерных сообщениях обсуждались проблемы современной протеомики, пришедшей вслед за геномикой. 24 самые крупные фирмы, работающие в этой области, организовали выставки своей продукции и приняли участие в финансовой поддержке форума.

В прекрасно иллюстрированном докладе L. Anderson (США) сформулировал общие положения по составлению протеомного индекса человека и привел некоторые уже существующие достижения в этой области. На первой же сессии обсуждались медицинские аспекты протеомики. И это не случайно, так

как медицинские аспекты протеомики (и это ее принципиальное отличие от геномики) уже сейчас вышли на первое место. Так, были обсуждены вопросы использования тропонинов I и T в качестве диагностических тестов при заболеваниях сердца, анализ других белков в поврежденном миокарде и т.д. Затем были обсуждены проблемы протеомики рака и возможные пути преодоления резистентности опухолевых клеток к действию различных лекарств. Обсуждались также диагностические маркеры диабета и протеомные подходы для создания новых лекарств для лечения туберкулеза.

Важное место в рамках готовящегося проекта «Протеом человека» должны занять протеомные исследования мозга.

Важным направлением протеомных исследований является изучение взаимоотношений между полиморфизмом, существующим в ДНК, и аминокислотным полиморфизмом. Современные технологии, используемые в геномике и протеомике, позволяют это сделать. На двух заседаниях обсуждались возможные перспективы использования протеомики для создания новых лекарств, анализ протеом растений в приложении к биотехнологии.

О том, какие грандиозные задачи стоят перед молодой наукой (особенно в области протеомики микроорганизмов и клеточной протеомики), наглядно свидетельствует доклад J. Kettman и соавторов (США). По данным этих авторов, активированный лимфоцит содержит 40000 транскриптов мРНК в каждый момент времени, причем каждый из них может существовать в более чем 5000 различных молекулярных формах, т.е. теоретически каждая из клеток может иметь набор, содержащий около 1 млрд. белковых молекул, некоторые из которых могут быть представлены в виде 10 млн. копий, а другие - в виде 1 - 10 копий на клетку. Следовательно, один ген в клетке может быть родоначальником целого семейства белков.

До сих пор протеомика считается наукой, в основе которой лежат три методических подхода: первый подход - двухмерный электрофорез, используемый для разделения белков и их первичной идентификации; второй подход (а именно этот подход сделал протеомику самостоятельной наукой) - использование масс-спектрометрии для идентификации белков и их секвенирования. В обоих случаях для обработки полученной информации мы нуждаемся в современных методах биоинформатики и в настоящее время ни у кого не вызывает сомнения, что биоинформатика (третий методический подход) при обработке результатов масс-спектрометрического анализа играет решающую роль. Среди методических проблем протеомики проблема двухмерного электрофореза является особенно актуальной. Хотя именно этот метод с помощью масс-спектрометрии и заложил основу протеомики как науки, в настоящее время он вызывает наибольшие нарекания. Дело в том, что именно двухмерный электрофорез является лимитирующим фактором развития протеомики, поскольку до сих пор является полуколичественным. Весьма вероятно, что в ближайшее время он, по-видимому, будет заменен на какой-то другой, но пока реальных кандидатов, которые бы заменили этот метод, нет.

Особенно важное значение проблема 2D-электрофореза имеет применительно к анализу мембранных белков, так как до сих пор протеомики мембранных белков не существует. T. Rabillond (США) так и озаглавил свой доклад «Никогда не заканчивающаяся история мембранных белков», в котором приведены веские аргументы в пользу того, что 2D - электрофорез не решит эту проблему. C.S.Klade (Австрия) предлагает новое приложение протеомного

анализа, а именно комбинацию 2D - электрофореза с 2D - иммуноблоттингом с целью идентификации антигенов путем их секвенирования. Метод получил название серологический протеомный анализ. Таким путем были идентифицированы 35 антигенов *S. aureus*. Среди них оказались как хорошо известные кандидаты на создание вакцин, так и другие предполагаемые.

Важным методом протеомных исследований является масс-спектрометрия. В Мюнхене различные фирмы продемонстрировали свои успехи в этой области; продемонстрированы огромные возможности метода масс-спектрометрического анализа, позволяющие работать на атомо-молярном уровне в полностью автоматизированном режиме. Более того, были даны некоторые примеры прямого использования метода масс-спектрометрического анализа для анализа сложных белковых смесей без предварительного их разделения. Развитие всех направлений в этой области сводится к попытке найти какую-то замену двумерному электрофорезу и перевести масс-спектрометрический анализ в область работы с фемто- и атомо-молярными уровнями концентраций исследуемых объектов. В докладе J. Vandekerckhove и др. (Бельгия), озаглавленном «Протеомика: сможем ли мы жить без гелей?», предлагается использовать для построения протеомных карт только пептиды, содержащие метионин, разделенные методом диагональной хроматографии. При этом в качестве первичного приложения протеомики рассматривается ее использование в диагностике различного рода заболеваний и для контроля лечения. Введено новое понятие «пептидомика», которое предусматривает одновременный массивный анализ пептидов в диапазоне до 10 - 15 кДа с использованием двумерной хроматографии и масс-спектрометрического анализа в диагностике целого спектра заболеваний. Отдельно были также обсуждены возможности использования различных методов биоинформатики в протеомике и по сути дела декларирована необходимость создания программ, специфичных для этой области знаний. Поставлен вопрос о как можно более быстрой аннотации протеом и (также как и в случае генома), переводе линейных белковых структур в трехмерное пространство. Основной вопрос, который обсуждался в большинстве методических сообщений сводился к одному: какой же метод придет на смену электрофорезу? То, что масс-спектрометрический анализ останется ядром современной протеомики и протеомики будущего, не вызывает никаких сомнений. При ответе на этот вопрос можно выделить три принципиально различающихся подхода:

1. Развитие масс-спектрометрического анализа и биоинформатики до такой степени, чтобы он сам по себе позволял анализировать сложные биологические смеси, в состав которых могут входить мембранные белки;

2. Использование одномерного электрофореза вместо двумерного с последующим анализом не отдельных белковых пятен, а всей области разделенных ДДС-электрофорезом белков. Современный масс-спектрометрический анализ позволяет это делать, а преимущество одномерного электрофореза перед двумерным, где второе направление (а именно изоэлектрофокусировка) до сих пор остается в значительной мере искусством, а не наукой, очевидно.

3. Использование многомерной хроматографии на первом этапе вместо электрофореза для разделения белковых смесей. Этот подход также имеет все очевидные преимущества, так как он является количественным и позволяет работать с электроспрейными детекторами в режиме "on line" или использовать

наиболее популярный метод MALDI-TOF-анализа через стадию роботизированных коллекторов.

И что совершенно новое, так это использование белковых полей для разделения сложного биологического материала и его анализа. Но, если до сих пор белковые поля делались на основе моноклональных антител и идентификации антигенов с помощью ELISA-подобных методов, что гораздо более дорогостоящий и сложный подход, чем в случае ДНК-полей, основанных на реакциях ПЦР и гибридизации, то в последнее время появились совершенно новые подходы. Они позволяют использовать вместо иммунологических подходов комбинации хроматографических и масс-спектрометрических подходов. Это так называемые поля, основанные на масс-спектрометрическом анализе в качестве конечного этапа в таких системах. Простейший принцип заключается в том, что биологический материал наносится на различные хроматографически-активные поверхности (гидрофильные, гидрофобные, катионные, анионные и т.д.), а затем адсорбированный белковый материал подается с помощью SELDI в масс-спектрометрический детектор и там анализируется. Преимущество такого подхода уже очевидно и в настоящее время первенство в этой области удерживает фирма "Ciphergen" (США), выпускающая с этого года такие поля уже на коммерческом уровне. И, наконец, еще один начинающий формироваться подход - это комбинированное использование биосенсоров с масс-спектрометрической детекцией образовавшихся комплексов. В этом плане используется следующий подход: иммобилизованный на поверхности биосенсора лиганд, в виде которого может выступать один из компонентов взаимодействующей пары, при добавлении сложного биологического материала специфически связывает те компоненты, которые с ним реагируют. Затем после удаления несвязавшегося материала образовавшиеся комплексы подвергаются масс-спектрометрической детекции и выясняется какой компонент взаимодействует с иммобилизованным белком, что собой представляют участки контакта этих двух молекул и т.д. Этот подход обещает оказаться очень перспективным не только для анализа сложных белковых смесей, но также и для решения проблемы белок-белкового взаимодействия, белок-белкового узнавания. В таком подходе участки взаимодействия двух белковых молекул могут быть легко выявлены в эксперименте и не будут уже лимитироваться результатами рентгеноструктурного анализа.

К сожалению, среди участников этого форума было представлено всего два постерных сообщения из нашей страны из НИИ БМХ РАМН: «Протеомный анализ белков мембран микоплазмы» (Говорун В.М. и соавторы) и «Создание протеомного индекса надсемейства цитохромов P450 (Арчаков А.И. и соавторы).

Анализируя итоги этого форума и состояние дел «в протеомном королевстве», можно сделать следующее заключение: протеомная наука развивается очень и очень быстро. Доминирующее положение в ней в настоящее время занимают не государственные структуры, а частные фирмы. Объясняется это тем, что протеомная наука очень дорогая. Стоимость современного комплекса для протеомного анализа лежит где-то в пределах от 1 млн. долл. и выше. Ясно, что ни академическая, ни университетская науки такой финансовой поддержки не имеют и в ближайшее время вряд ли будут иметь. В случае нашей страны речь, очевидно, должна идти о создании нескольких крупных центров протеомных исследований с серьезной государственной поддержкой. Это позволит нам «вскочить на подножку» уходящего «протеомного экспресса». Лимитирующим

является также и наличие специалистов высокого класса в области масс-спектрометрического анализа.

Не вызывает также сомнения, что протеомика пришла в нашу жизнь всерьез и надолго и задачи ее гораздо сложнее, чем задачи геномики. Разница заключается в том, что в случае анализа генома мы довольствуемся данными об информационном материале клеток, который в значительной мере идентичен в пределах одного вида и различных состояний. В случае протеомного анализа мы имеем дело не с десятками или даже с сотней тысяч генов в одном геноме, а с десятками миллионов белков, концентрация которых весьма специфична для различных состояний клеток и организма и резко меняется при различных патологических состояниях. Поэтому задача идентификации и составления протеомного индекса человека, выявления белковых маркеров различных патологических состояний на несколько порядков сложнее тех задач, которые решала и решает современная геномика.

Поступила 24.09.01.