

УДК 577.151
©Копылов, Згода

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ В ПРОТЕОМИКЕ

А.Т. Копылов, В.Г. Згода*

Институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН, 119121 Москва,
ул. Погодинская, 10, факс +7 (495) 245 08 57, эл.почта: pantalassae@gmail.com

В современной науке техника протеомного анализа находится в неразрывной связи с другими отраслями системной биологии. Обладая широкими возможностями, количественная протеомика оперирует колоссальным массивом данных о молекулярных механизмах, лежащих в основе жизни. Достижения протеомики помогают исследователям решать сложные вопросы клеточной сигнализации, посттрансляционных модификаций, структурной и функциональной гомологии белков, молекулярной диагностики. В протеомике было разработано свыше 40 различных методов для осуществления количественного анализа, и, хотя, каждый из них по-своему уникален и обладает рядом преимуществ и недостатков, все их можно объединить под “единым флагом” использования изотопной метки. В обзоре рассмотрены наиболее популярные и самые эффективные современные подходы количественной протеомики, использующие как химические модификации белков, так и метаболические и ферментативные методы включения изотопной метки.

Ключевые слова: количественная протеомика, масс-спектрометрия, изотопная метка, химическая модификация.

ВВЕДЕНИЕ. Протеомика – область науки, занимающаяся системным исследованием структуры, функции и активности белков, белок-белковых взаимодействий, определение уровня экспрессии генов. Развитие технического обеспечения для многомерного разделения белков и пептидов, появление более быстрых и чувствительных масс-спектрометров, биоинформационных методов – все это позволило достигнуть большого количества и качества информации, получаемых из протеомных данных. Основной вклад в развитие современной количественной протеомики внесла технология химической модификации белковых молекул. Зародившись еще в 60-70-х годах прошлого столетия, она заложила прочный фундамент технологии применения химической модификации белков, как основного инструмента, позволяющего осуществлять абсолютные и

Список сокращений: 2D-PAGE – (two Dimensional Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) – двумерный электрофорез в полиакриламидном геле; CID – (Collision Ion Dissociation) – ионная диссоциация, вызванная столкновением; ECD – (Electron Capture Dissociation) – ионная диссоциация, вызванная захватом электрона; ESI – (Electro Spray Ionization) – электростатическое распыление; ETD – (Electron Transfer Dissociation) – ионная диссоциация, вызванная переносом электрона; FD – (Fluorescence Detection) – детекция по флуоресценции; FT-ICR-MS – (Fourier Transformation Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry) – масс-спектрометрия с Фурье преобразованием ионного резонанса; LC – (Liquid Chromatography) – жидкостная хроматография; MALDI – (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization); MS – (Mass Spectrometry) – масс-спектрометрия; MS/MS – (tandem Mass Spectrometry) – тандемная масс-спектрометрия; PAGE – (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) – электрофорез в полиакриламидном геле; TOF – (Time Of Flight) – время пролёта.

* - адресат для переписки

относительные количественные измерения белковых молекул, даже прошедших стадию посттрансляционных изменений. Появление так называемых изотопных меток получило широкое применение и признание в научном мире, как наиболее эффективное решение исследовательских вопросов в протеомике.

В этой работе мы рассмотрим некоторые моменты развития методологии количественной протеомики. В связи с этим в обзор включены разделы, посвящённые историческому развитию количественной протеомики, основные подходы белковой химии, описание и характеристика мишеней, применяемых в модификационной химии, техническая и биоинформационная база, как современный подход в анализе протеомных данных. Из-за огромного количества данных, встречающихся в литературе, мы остановимся на результатах последних лет, и уделим внимание преимуществам и недостаткам наиболее интересных и широко используемых методов.

1. ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА.

Количественная протеомика обеспечивает системный анализ о содержании белков и их модифицированных форм. Огромный вклад в развитие протеомики внес метод двумерного электрофореза (2D-PAGE). Приблизительно с середины 1970-х годов и на протяжении более 25 лет, 2D-PAGE занимал основное место в методологии количественной протеомики благодаря своей высокой разрешающей способности. На рисунке 1 представлена схема определения содержания белковых продуктов, которое достигалось, в общем случае, сравнительным анализом окрашенных гелей, на которых представлены разделенные белковые молекулы из лизата клеток в различных состояниях, и последующей их идентификацией MS анализом (масс-спектрометрией).

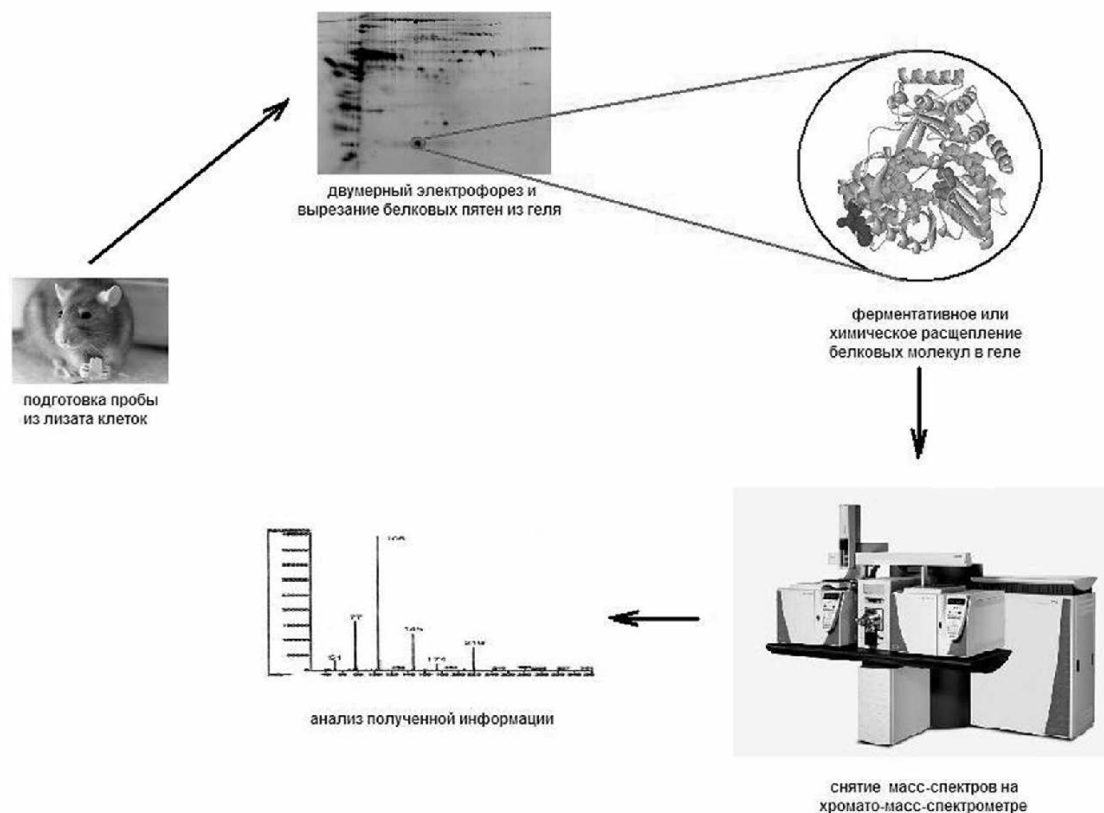


Рисунок 1.

Идентификация белков в биопробах. Белки из лизата клеток разделяют в геле методом двумерного электрофореза. Пятна из окрашенных гелей вырезают и проводят гидролиз белков в геле. Полученные пептиды анализируют снятием масс-спектров.

Разделение молекул происходит по двум параметрам, характерным для каждого индивидуального белка: в соответствии со своим зарядом в одном направлении и электрофоретической подвижностью в акриламидном геле определенной плотности, коррелирующей с молекулярной массой, - в другом. Относительная количественная оценка осуществляется при сравнении протеомного профиля двумерных карт и денситометрировании пятен, соответствующих белков. Однако, высокой воспроизводимости экспериментов достигнуть было сложно из-за различной чувствительности окрашивающих агентов, условий полимеризации акриламидных гелей и разделения белков, а также многостадийности в подготовке гелей первого и второго направлений. Попытки преодоления этих проблем привели к разработке дифференциального двумерного электрофореза 2D-DIGE [1-4] (рис. 2).

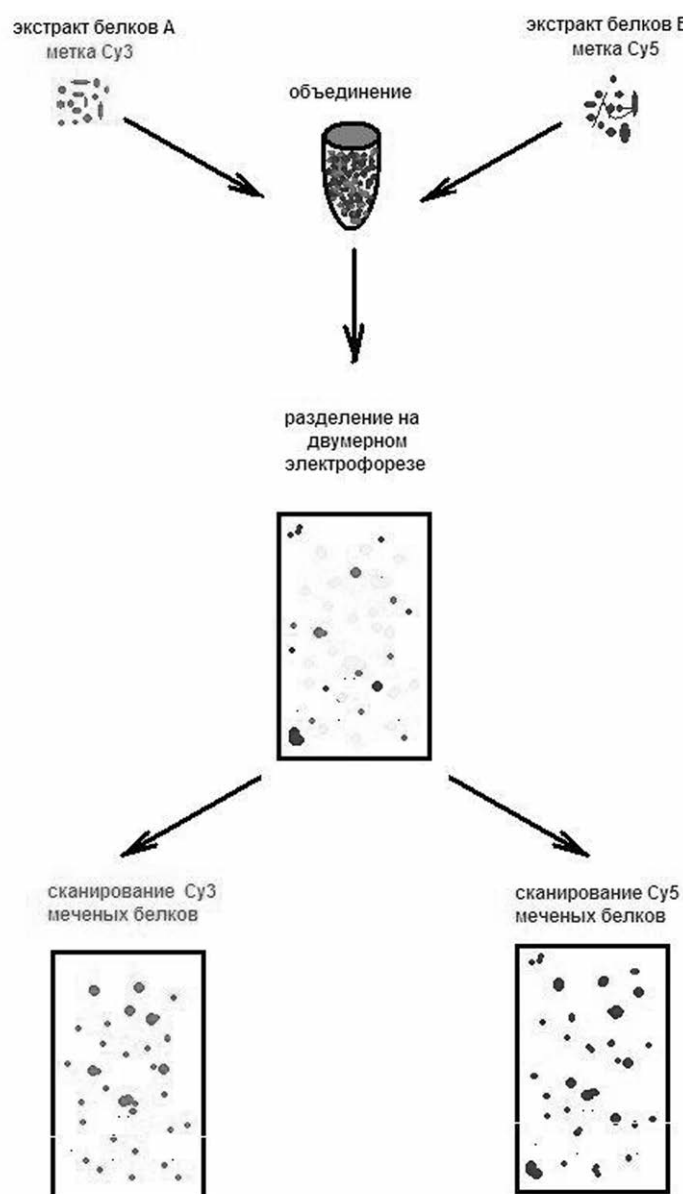


Рисунок 2.

Схема проведения двумерного дифференциального электрофореза. Контрольный и опытный образцы метятся различными флуоресцентными метками, смешиваются и разделяются в геле.

Картина двумерного электрофореза сканируется на различных длинах волновой эмиссии, характерной для того или иного флуорофора. Анализ проводится путем наложения сканов и поиском различий и совпадений в пробах.

Контрольный и опытный образцы метили с использованием циановых флуорофоров (Cy3 и Cy5), прочно связывающихся с ϵ -аминогруппой боковой цепи лизина, и смешивали в эквимольных по белку соотношениях для дальнейшего разделения в одном геле. Дифференциальная количественная оценка определялась сравнением двух изображений, полученных при сканировании гелей на различных длинах волн, характерных для эмиссии каждого флуорофора. В дальнейшем, использование этого метода привело к введению еще одного, третьего, флуорофора – Cy2 [5, 6] и созданию новых версий Cy3 и Cy5 [7-9], связывающих цистеин, но эта инновация привела лишь к усложнению процедуры пробоподготовки и дороговизне материала.

Большую роль в разделении протеома (совокупности всех белков, характерных для данного организма) на индивидуальные белки сыграли методы, основанные на жидкостной хроматографии и включающие в себя жидкофазное изoeлектрофокусирование [10-12], хроматофокусировку [13-17], ион-обменные [18] и смешанные носители, исключающие по размеру молекул и по их заряду, - все использовались в качестве первого направления перед обратно-фазной жидкостной хроматографией. Каждый из перечисленных подходов давал довольно хорошую разрешающую способность, однако, ни один из них не позволял разделить целый протеом (то есть более 10^4 белков). Становилось ясно, что будущее протеомики зависит от усиления различных технологий многомерного разделения. Ион-обменная хроматография пользовалась большой популярностью для разделения белков перед PAGE [19], но в тоже время существовал один недостаток: определенная часть белков из образца не будет связываться с полностью положительно или отрицательно заряженными носителями из-за неоднородности зарядов поверхности молекулы белка. Эффективное связывание с носителем и разделение может быть достигнуто комбинированием носителей, как было показано ещё El Rassi и Horvath [20] в экспериментах с разделением простых смесей. Однако, дальнейшего развития эта идея не получила.

Несмотря на то, что ни один из методов хроматографического разделения белков с высоким разрешением не обладал возможностью представить количественную оценку содержания того или иного белка в смеси, достижения этой методологии не были забыты и нашли свое применение в альтернативной двумерному электрофорезу стратегии протеомного анализа.

Масс-спектрометрия сочетает в себе разделение сложных композиций белков и пептидов с аминокислотным секвенированием тандемной масс-спектрометрией (MS/MS). На сегодняшний день известна первичная структура около 270 тысяч белковых молекул, полученных различными путями: классической деградацией по Эдману, ядерно-магнитным резонансом, малоугловым рентгеновским рассеиванием и масс-спектрометрией. Тем не менее, масс-спектрометрия не может до конца обеспечить информацию о количественном содержании белков в протеоме напрямую, ввиду ограниченных технических возможностей, способности ионизации, которая является индивидуальной характеристикой пептида, и многих других факторов физико-химического характера. Однако в наши дни исследователи создали ряд подходов, сочетающих в себе химические модификации белковых молекул и их изотопное мечение, которое в значительной степени является вспомогательным инструментом для получения данных по оценке относительного, а в некоторых случаях даже и по абсолютного содержания белков в протеоме организмов в различных условиях.

Начиная с 1999 года тандемная масс-спектрометрия проводится в сочетании с изотопным мечением, обеспечивая, таким образом, количественную оценку [21-23]. Одно из наиболее ранних исследований в количественной протеомике с использованием изотопной метки было проведено на двух культурах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В качестве объекта исследований, авторы использовали мутантный и дикий тип дрожжей, выращиваемых на среде, обогащённой ^{14}N или ^{15}N [22-25]. Методы количественной оценки с использованием изотопной метки

основаны на определении отношений площадей MS и MS/MS пиков пептидов химически идентичных, но с определённым сдвигом молекулярной массы. Процедура состоит из следующих этапов: дифференциальное изотопное мечение белковых смесей; ферментативное расщепление объединенных дифференциально меченых смесей; разделение пептидов многомерной жидкостной хроматографией; MS/MS анализ разделённых пептидов. В наши дни существует множество меток, различающихся по массе, природе составляющих ее изотопных атомов, связываемостью и специфичностью к аминокислотам. Такое высокое разнообразие требует различных технологий и подходов для инкорпорирования их в полипептиды или белки.

Внедрение изотопов проводят различными путями, включая метаболическое мечение, ферментативное, химическое, твердофазный метод выделения и др. Мечению могут подвергаться и целые белковые молекулы, например, при метаболическом мечении, хотя этот метод не получил широкого распространения, так как из-за необходимости метаболической доступности изотопов применим только к культурам *in vitro*: прокариотам, дрожжам, *C. elegans* и *D. melanogaster*. Также можно избирательно изотопно метить редко встречаемые в полипептидной цепи белков аминокислотные остатки: цистеин, тирозин, метионин, триптофан. Наиболее часто в изотопном мечении белков используют атомы ^{13}C , D, ^{15}N . Существуют технологии изотопного мечения пептидов по их N-концу или свободным аминогруппам лизина, амидным группам глутамина или аспарагина. Реже мечение проводится по C-концевым остаткам пептидов или свободным карбоксильным группировкам аминокислотных остатков в пептиде. Основная причина, по которой C-концевое мечение не стало столь же популярным, как и N-концевое, заключается в том, что карбоксильную группу на конце пептида достаточно трудно отличить от карбоксильной группировки глутаминовой или аспарагиновой кислот, поэтому любые модификации будут приводить к множественным вставкам изотопной метки по всем сайтам в пептиде, обладающим кислым характером. Самое широкое распространение получил так называемый ICAT (Isotope Coded Affinity Tag). Химически идентичные, но различающиеся по изотопному составу атомов, ICAT метки ковалентно связываются с аминокислотными остатками цистеина в полипептидах [25].

2. ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИЗОТОПНОГО МЕЧЕНИЯ В КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПРОТЕОМИКЕ.

2.1. ICAT (сайт-специфическое мечение по цистеинам).

ICAT - хорошо описанный метод, используемый при определении относительного количественного содержания белков [23, 26, 27]. Прототип ICAT был описан еще Aebersold и Mann (рис. 3) [28, 29]. Первоначально, ICAT-комплекс представлял собой реакционную йодацетатную цистен-связывающую группировку, соединенную через полиэфирный линкерный регион с биотиновой группировкой, что в значительной мере упрощало процедуру выделения меченых пептидов на колонке с авидином. ICAT, содержащий 8 атомов дейтерия [D_8] в полиэфирном регионе, называется тяжелой цепью; если в цепи вместо атомов дейтерия 8 атомов водорода [H_8], то она называется легкой. На рисунке 4 приведена схема общего плана проведения эксперимента с использованием изотопной метки ICAT.

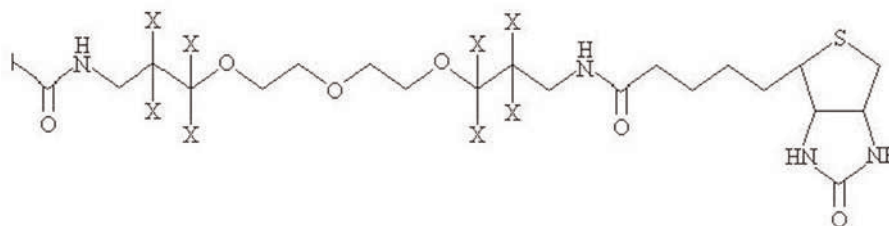


Рисунок 3.

Структурная формула изотопной метки ICAT: реакционная йодацетатная связывающая цистеин группировка, соединённая через полиэфирный линкерный регион, содержащий 8 атомов дейтерия в тяжелом варианте цепи или 8 атомов водорода (отмечены X) в легкой, с биотиновой группировкой.



Рисунок 4.

Схема общего плана эксперимента с применением изотопной метки по технологии ICAT.

Метод основан на ковалентном мечении цистеинового аминокислотного остатка в полипептидной цепи химически идентичными, но изотопно разными реагентами ICAT. Последующие стадии протеолиза, многомерной жидкостной хроматографии и MS-анализа давали исследователю информацию о последовательности изолированных пептидов и их относительном содержании [23, 25]. Однако, некоторые белки не содержат в своем составе Cys, что делает невозможным их идентификацию и количественную оценку.

В новом варианте ICAT технологии присутствуют внутренние стандарты, меченые легкой цепью, позволяющие использовать их для абсолютного количественного определения белков в исследуемых образцах, меченых тяжелой цепью.

Несмотря на популярность этого метода среди исследователей, он обладает рядом недостатков. Например, использование дейтерия для специфичного мечения приводит к хроматографическому разделению легких и тяжелых вариантов химически идентичных пептидов. Во-вторых, размер метки слишком велик (450 Да), что также усложняет анализ MS/MS спектров. На этапе аффинной хроматографии нередко происходило необратимое или неспецифичное связывание пептидов. В конечном счете, работа только лишь с содержащими цистеин формами пептидов представляла собой потерю информации о посттрансляционных модификациях [30].

В 2002 году компания Applied Biosystems (США) создала новый расщепляемый аналог cIcAT (Cleavable Isotope Coding Affinity Tag). Расщепляемые cIcAT реагенты представляют собой реагирующую с сульфгидрильной группой метку, отщепляемый биотиновый “хвост” и линкерную последовательность, за счет наличия в которой девяти ^{12}C или ^{13}C атомов ей присваивался статус тяжелой или легкой цепи. Контрольный и исследуемый образцы метили тяжелым или легким вариантом, смешивали, ферментативно расщепляли и анализировали LC-MS. Относительная высота пиков пептидов, меченых ^{12}C или ^{13}C вариантом cIcAT, обеспечивала информацию об относительном содержании соответствующих белков в различных образцах. Меченые ^{13}C пептиды давали сдвиг на 9 Да по сравнению с C^{12} – вариантами. Впервые cIcAT применили в 2003 году [31-33], и с этого момента новая версия ICAT получила признание в мире. Yu и соавторы [34] сообщили о своих экспериментах, в которых говорилось об эффективности cIcAT метки, специфичности, возможных проблемах, возникающих на этапе аффинной очистки, хроматографической коэлюции пептидов, меченых тяжелой или легкой цепью и точности относительной количественной оценки. Некоторые аспекты воспроизводимости и точности экспериментов с cIcAT также обсуждались в публикациях группы Parker [35] и Molloy [36]. Дальнейшие наиболее интересные исследования с применением cIcAT метки включают в себя идентификацию в белках тиольных группировок, чувствительных к окислению [37, 38], и использование этой стратегии для идентификации белков в различных субклеточных органеллах [39-41]. Одно из последних сообщений о новом применении cIcAT появилось в работе Jenkins и соавторов [27], в которой эта технология была использована для количественных измерений абсолютного содержания изоформ цитохрома P450, выделенных из печени мыши. В экспериментах cIcAT показал себя как довольно чувствительный метод, с использованием которого авторы смогли идентифицировать Cyp1a1, который не детектировался в контрольных образцах. Для абсолютного количественного измерения 16 изоформ цитохрома P450 они применили несколько модифицированный протокол cIcAT. Метод позволял идентифицировать и проводить количественную оценку 50-100 белков одновременно. С помощью химии FMOС были синтезированы пептиды, содержащие цистеновые остатки, входящие в первичную последовательность исследуемых цитохромов. Пептиды известной концентрации метили легкой цепью cIcAT и использовали в работе в качестве внутренних стандартов. Таким образом, полученные данные об абсолютном количественном содержании цитохромов P450 представляли на уровне подсемейств. Безусловно, что эффективность определения содержания белков зависела от аминокислотного состава пептидов и их элюции с колонки.

В результате, данные по абсолютным и относительным измерениям практически полностью соответствовали друг другу и данным по профилю экспрессии тех или иных изоформ цитохрома P450 в контрольных образцах и исследуемых тканях печени мышей, которым вводился классический индуктор цитохромов P450 фенобарбитал. Лишь в случае с цитохромами Cyp3a/11/16/41 наблюдались некоторые расхождения в данных по абсолютной и относительной количественной оценке.

Авторы утверждают, что, хотя они и не использовали полный потенциал (как минимум 50 белков), но метод оказался очень чувствительным, специфичным и позволяющим анализировать несколько белков параллельно.

Ranish и соавторы [42] проводили эксперименты по количественной протеомике со сложными многокомпонентными белковыми комплексами. Они изучали содержание субъединиц преинициаторного комплекса РНК-полимеразы-II (PIC II, около 68 субъединиц). Белки контрольного, очищенного на катионообменной колонке комплекса метили легкой и тяжелой цепью ICAT и подвергали последующему протеолитическому расщеплению трипсином. Меченые пептиды анализировали при помощи microLC-ESI MS/MS. В результате было показано, что около 58% идентифицированных белков (189 из 326) в выделенных фракциях не имеют отношения к PIC II. В статье утверждается, что с применением многомерной хроматографии и ICAT технологии удалось идентифицировать и проанализировать белки, участвующие в транскрипции, не затрагивая при этом примесные. Всего исследователи провели количественную оценку 206 белков, хотя, как сообщается в то же время, что некоторые субъединицы РНК полимеразы II (приблизительно 10%, 7 из 68) не были проанализированы ввиду отсутствия цистеин-содержащих ионов триптических пептидов с m/z 1+, 2+, 3+. Специалисты предлагают преодолеть эту проблему путем использования N-концевого изотопного мечения.

Ranish et al. сообщили о том, что наблюдается небольшое различие во времени элюции с колонки пептидов с тяжелой и легкой цепью cICAT. Используя cICAT группа, Min Shen [43] также встретила много проблем в своих исследованиях. Во-первых, MS/MS анализ выявил присутствие пептидов, не содержащих цистеин. Причем, сигнал таких неспецифически связанных пептидов был довольно сильным и сравнимым с сигналом cICAT-меченых пептидов, содержащих в своем составе остатки цистеина. Во-вторых, несмотря на использование специфического ингибитора трипсина и промывку авидиновой колонки буфером с pH 5, авидиновые триптические пептиды четко фиксировались на спектрах. В-третьих, ICAT добавляет 450 Да к молекулярной массе. Если пептид содержит в первичной структуре более одного остатка цистеина, то и массакратно увеличивается, что в значительной степени отражается на качестве MS/MS спектров. В-четвертых, модификация пептидов ICAT повышает зарядное состояние, что не очень хорошо сказывается на качестве данных.

Однако, несмотря на описанные все выше недостатки этого метода, технология cICAT до сих пор занимает важное место в протеомных исследованиях благодаря своей разрешающей способности в количественных исследованиях, возможности охватывать в исследованиях большую часть белков протеома при наличии в них цистеинов и относительной простоте самой процедуры изотопного мечения.

2.2. ICROS (метионин- и цистеин специфичное мечение).

Пытаясь преодолеть все неудобства и недостатки метода ICAT, группа Min Shen [43] разработала новый и недорогой метод ICROS (Isotope Coded Reduction Off of Chromatographic Support). Метод не отличается особой сложностью и оригинальностью, но обладает высокой эффективностью. Первым этапом в ICROS-методе служит растворение белка, денатурация и восстановление дисульфидных связей с последующим протеолитическим расщеплением анализируемых белков в денатурирующих условиях в присутствии мочевины. В дальнейшем происходит освобождение от солей и восстанавливающего дисульфидные связи агента при помощи твердофазной экстракции SPE (solid-phase extraction) на коммерческой колонке и обогащение цистеин-содержащими пептидами пиридил дисульфидной колонки с последующей элюцией связавшихся пептидов. После очистки, пептиды подвергаются алкилированию реагентами с дейтерием [D]. В данной работе, в качестве алкилирующего изотопного реагента использовались N-этильодацетамид и N-[D₅]-этильодацетамид, которые давали разницу молекулярной массы в 5 Да. Согласно стандартной процедуре, после

алкилирования пептиды метились тяжёлым и легким реагентами и смешивались для проведения анализа на LC-MS.

Пептиды, не связавшиеся с пиридилдисульфидной колонкой, были изотопно мечены по метиониновым аминокислотным остаткам (ацилированы) N-гидроксисукцинимидным эфиром $[D_0]$ - или $[D_4]$ -никотиновой кислоты. Это также позволило исследователям сохранить аминокруппы и не вызвало отрицательного эффекта на чувствительность масс-спектрометрической детекции. Образовавшиеся О-эфиры гидролизировались с применением гидроксиламин гидрохлорида. В дальнейшем, метионин-содержащие пептиды выделялись с использованием коммерческой колонки BioMolecular Technologies (Sunnyvale, USA). В результате, в эксперименте анализировались как цистеин-, так и метионин-содержащие пептиды, что позволяло получить больше информации и исключить некоторые артефактные явления, характерные для ICAT-технологии.

Основные характерные черты ICROS, которые выявились в ходе экспериментальной работы, можно обозначить следующим образом: во-первых, не были обнаружены неспецифично связанные пептиды; во-вторых, исчезала потенциальная проблема загрязнения образцов трипсинолизированными фрагментами пептидов с авидином после элюции, которые всегда сопровождали исследуемый образец в ICAT методе. В-третьих, алкилирование N-этилйодацетамидом и N- $[D_5]$ -этилйодацетамидом дает лишь 85 и 90 Да дополнительной молекулярной массы на каждый цистеиновый аминокислотный остаток в пептиде, и, таким образом, заряд исследуемых белков не меняется. Эффективность внедрения метки методом ICROS составила около 55-75% в зависимости от аминокислотной последовательности пептидов.

ICROS весьма схож с методом, который ранее использовали Wang и Regnier [44], но в отличие от последнего, его отличают более высокая чувствительность и простота. Эти авторы первыми внебрили изотопное мечение через сукцинирование аминокруппы ($[D_0]$ - и $[D_4]$ -янтарный ангидрид), тем самым основные группировки приобретали кислотные свойства за счет присоединения карбоксильной группы. Чтобы преодолеть плохую растворимость пиридилдисульфидных реагентов, авторы связывали сукцинированные пептиды на обращенно фазовой колонке, играющей роль реакционной камеры, в которой разведённый раствор пиридилдисульфида непрерывно омывал иммобилизованные пептиды. Затем пептиды элюировали с колонки и смешивали с тиопропил-сефарозой, на которой пиридилдисульфидно-меченые пептиды формируют дисульфидные связи с носителем. После чего, колонку промывали восстанавливающими агентами и пептиды одновременно с этим алкилировали йодацетатом.

В отличие от вышеописанного метода, в ICROS пептиды уже дериватизированы пиридилдисульфидом, и поэтому нет необходимости в этапе формирования смешанных дисульфидов. Также, в ICROS происходит одновременное формирование смешанных дисульфидов. Дальнейшие шаги по элюции цистеин-содержащих пептидов, изотопному мечению и алкилированию N- $[D_0]$ - или N- $[D_5]$ -этилйодацетамидом происходят одновременно, при этом их аминокруппы остаются немодифицированными. Авторы говорят об усилении чувствительности данного метода с применением таких химических модификаций по сравнению с методом Wang и Regnier.

По сравнению с ICAT, ICROS обладает рядом очевидных вышеперечисленных преимуществ, делающих его более удобным в экспериментальной работе. Однако, ICROS также свойственен ряд недостатков. Одно определенное методическое отличие ICROS от ICAT заключается в том, что мечение пептидов происходит после их протеолитического расщепления. Эта технология обладает существенным недостатком - изотопно меченые пептиды не смешиваются вместе до последнего этапа, что приводит к разделению работы с контрольным и исследуемым образцами на всех предшествующих этапах: пептиды должны быть по отдельности расщеплены, сшиты с пиридилдисульфидом и помечены изотопами

до смешивания. Безусловно, что раздельная работа с пептидами до их смешивания, способна приводить к артефактам в дальнейшем исследовании, как результат ошибок и погрешностей на каждом этапе эксперимента, но снижение рутинности этой работы в будущем можно будет достичь с помощью автоматизации.

2.3 Гуанидирование (лизин-специфичное мечение).

Гуанидирование – это довольно простая форма химической модификации, при которой С-концевые аминокислотные остатки лизина пептидов (после ферментативного расщепления трипсином) в химической реакции с метилизомочевинной превращаются в гомоаргинин (рис. 5). Такая несложная реакция приводит к повышению основности самих пептидных ионов и увеличивает их детектируемость.

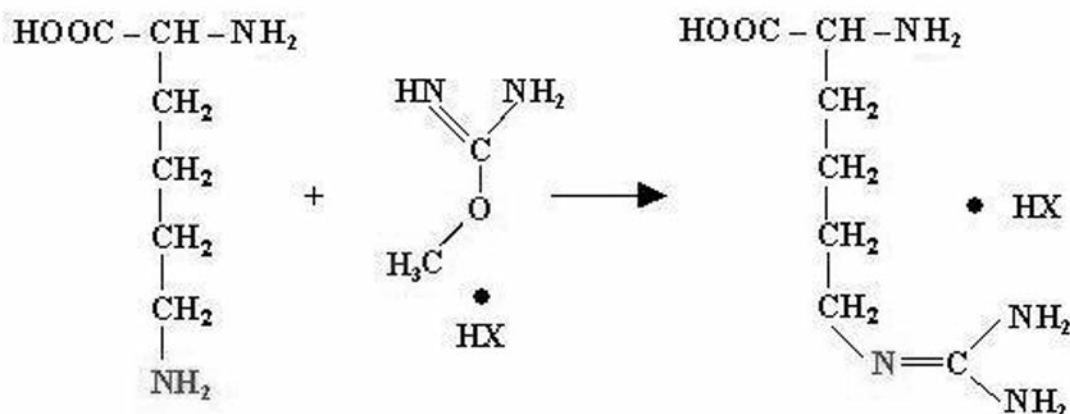


Рисунок 5.

Химизм реакции гуанидирования с образованием гомоаргинина из лизина.

Необходимо отметить, что в отличие от многих других методов модификационной химии, гуанидирование позволяет пришивать к пептидам различные изотопные метки, и это дает исследователю значительные преимущества и гибкость в аналитическом подходе.

В своей работе Warwood и соавторы [45] использовали химию гуанидирования для относительного количественного протеомного измерения белков, выделенные из культуры клеток мыши FDCP-mix cells. Белки подвергали ферментативному гидролизу в геле, и смесь полученных пептидов метили *o*-метилизомочевинной, содержащей изотопы азота [¹⁵N] или [¹⁴N]. В результате проводимой реакции на выходе получается продукт в форме аналога аргинина – гомоаргинин (производное лизина), дериватизированного O-[¹⁴N]- или O-[¹⁵N]-метилизомочевинной. Дериваты смешивали, обессоливали и анализировали MALDI-MS. Массовая разница между изотопно мечеными производными составляет всего лишь 2 Да, что представляет определенную проблему при перекрывании химически-меченых изотопов с естественным изотопным распределением.

Из 46 проанализированных белковых пятен в 2D-геле, исследователи идентифицировали 42 белка, из которых у 36 после дериватизации было обнаружено повышенное число совпадения пептидов, а у 30 – больший процент покрытия аминокислотной последовательности. Авторы приписывают такие результаты повышенной основности белков после их дериватизации, что благоприятно сказывается на чувствительности измерения и расширяет возможности детекции белков по большему числу ионизированных пептидов.

2.4 Изотопное мечение по лизину и свободным NH_2 -группам.

В протеомике известно много методов мечения по первичным α -аминогруппам для количественного анализа. Один из таких способов описан в работе Hoang и соавторы [46]. Работа примечательна и интересна тем, что исследователи использовали двустадийное мечение. На первом этапе эксперимента они использовали сульфосукцинимидил-2-(биотинамидо)-этил-1,3-дителиопропионат, который вступает в реакцию с первичными аминогруппами, такими как у лизина или у немодифицированных N-концевых групп пептидов. Затем, на втором этапе, авторы применяли изотопную метку в виде ^{12}CD - или $^{13}\text{CD}_3$ -метилйодида. Ковалентное связывание с биотинсодержащей меткой позволило довольно легко выделить интересующие пептиды на колонке с иммобилизованным стрептавидином. Дисульфидная связь в линкерном участке выполняет две функции. Во-первых, она обеспечивает удобные условия для элюции пептидов с колонки путем промывания ее восстанавливающим агентом. Во-вторых, после элюции восстановленные тиольные группировки используются для метилирования изотопной меткой. Такой механизм позволяет включить легкую или тяжелую метку для дальнейшей количественной оценки.

В пробном эксперименте авторы статьи использовали в качестве объекта исследования брадикинин. Дериватизация с использованием сульфосукцинимидил-2-(биотинамидо)-этил-1,3-дителиопропионата оказалась достаточно эффективной, так как анализ MALDI-TOF не показал присутствие пиков, соответствующих немодифицированному брадикинину. Для элюции с колонки в качестве восстанавливающего реагента использовали ДТТ, что стало причиной снижения массы пептидов на 301,4 Да - это соответствует биотиновой группировке с частью линкерного участка. Алкилирование добавило 14 Да молекулярной массы (хотя была зафиксирована небольшая доля неалкилированных пептидов), которое дало разницу в 4 Да между пептидами, мечеными тяжелой или легкой изотопной меткой.

Метод, представленный Hoang с соавторами, аналогичен ICAT, однако отличается от него рядом своих особенностей. Во-первых, сульфо-NHS-SS-биотин содержит расщепляемый линкерный участок, который удаляется перед масс-спектральным анализом. Во-вторых, как уже упоминалось в этом обзоре, коммерческие cICAT с расщепляемым линкером также существуют в двух вариантах: фоторасщепляемые и кислотнорасщепляемые. Однако, расщепление cICAT происходит в два этапа и постэлюционно с авидиновой колонки, тогда как в данном методе расщепление и элюция с колонки происходят одновременно, что делает процедуру легче и быстрее. В-третьих, стоимость сульфо-NHS-SS-биотина и ^{12}CD - или $^{13}\text{CD}_3$ -метилйодида несравнимо ниже стоимости cICAT. В-четвертых, данный метод направлен на аминокислотные остатки лизина и свободные немодифицированные концевые аминогруппы, а ICAT, как известно, модифицирует цистеин, который встречается в белках реже. Мечение лизина позволяет охватить больший процент исследуемых пептидов и, следовательно, увеличить вероятность идентификации белков.

2.5 Твердофазное изотопное мечение (лейцин) SIT.

Оригинальный подход в изотопном мечении нашли Zhou и др. В своих исследованиях [47] они применили так называемое твердофазное сайт-специфичное изотопное мечение (SIT, Solid-phase Isotope Tagging) остатков цистеина в сложных пептидных смесях. На рисунке 6 показано, что фотореакционный линкер на основе *o*-нитробензила наносится на стеклянную твердую фазу, покрытую аминпропилом. К фотореакционному линкеру по технологии, применяемой в твердофазном пептидном синтезе соединен лейцин, содержащий 7 атомов водорода $[\text{D}_0]$ -Leu или дейтерия $[\text{D}_7]$ -Leu. Сульфгидрил-специфичная йодацетильная группировка пришивается к N-концу лейцина. После протеолитического расщепления, цистеин-содержащие пептиды исследуемых образцов реагировали с йодацетильной группой, связанной с меткой на твердой

фазе, и затем данный комплекс был подвергнут мягкой фотообработке в ближнем ультрафиолетовом свете при 360 нм для минимизации побочных фотокатализируемых реакций. В результате наблюдается высвобождение изотопсодержащего лейцинового хвоста от твердой фазы, который остается при этом пришитым к цистеиновому аминокислотному остатку пептида.

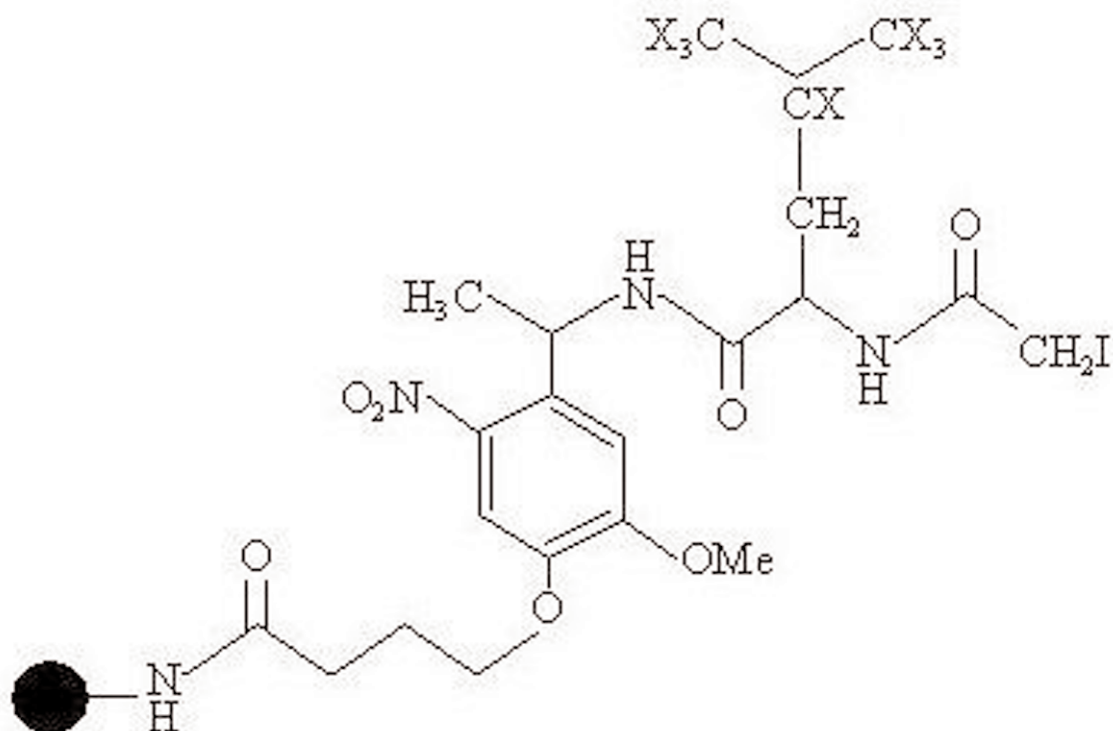


Рисунок 6.

Структура молекулы, содержащей изотопную метку. Фотореакционный линкер на *o*-нитробензильной основе наносится на стеклянную твердую фазу, покрытую аминопропилом. Лейцин содержит 7 атомов водорода или дейтерия. К N-концу лейцина пришта сфидрил-специфичная йодацетатная группировка (X = H или D).

Эксперимент с ламинином В, содержащем цистеины, и фосфоангиотензином I проводился параллельно с ICAT. Через один час фотоинкубации, был обнаружен сдвиг интенсивности MS сигнала ламинина В на 170 Да, что соответствует массе лейцин-содержащей модифицирующей группировке. Это также было подтверждено MS/MS анализом. Интенсивность сигнала модифицированного и немодифицированного ламинина В в сравнении с данными, полученными по фосфоангиотензину I, говорят о высокой специфичности изотопного реагента. Косвенным свидетельством в пользу того, что реакция с меткой прошла успешно, может служить факт задержки элюции модифицированного ламинина В, по сравнению с немодифицированной формой (из-за гидрофобной природы лейцина). Также, было замечено, что более продолжительное проведение фотореакции не оказывает никакого воздействия на выход ламинина В.

В сравнительных экспериментах с cICAT по протеому дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, твердофазный метод показал гораздо лучшие результаты по такому показателю, как число идентифицированных белков и их количественная оценка. Например, твердофазным мечением удалось определить больше белков, вовлеченных в расщепление галактозы (GAL1, GAL2, GAL7, GALX),

тогда как с использованием cICAT-метки был определен только один белок - GAL1 [47].

Обладая рядом преимуществ, твёрдофазное мечение зарекомендовало себя как более простой, чувствительный, эффективный и воспроизводимый метод. Во-первых, выделение пептидов с цистеинами и их химическая модификация происходят в один этап. Во-вторых, ковалентное связывание цистеин содержащих пептидов к носителю с изотопной меткой облегчает условия их дальнейшей очистки и элюции. В-третьих, присутствие протеолитических ферментов и детергентов не оказывает влияния на реакцию, таким образом, отпадает необходимость в дополнительных процедурах по очистке пептидов от них. Как видно, в твердофазном методе производится меньше манипуляций. Метод подходит для изучения индуцируемых какими-либо биологическими процессами белков, присутствующих в клетке в малых концентрациях. В-четвертых, метод позволяет включение любых аминокислот, вместо пары $[D_0]$ -Leu/ $[D_7]$ -Leu, таким образом, можно синтезировать множество изотоп-содержащих меток, пришитых к носителю. В-пятых, масса самой метки после ее ковалентного связывания с цистеином, составляет всего лишь 170 Да для $[D_0]$ -Leu. В отличие от ситуации с ICAT, на MS/MS спектре отсутствуют сигналы от побочных продуктов распада реагента. И, наконец, перед проведением фотореакции, ковалентно иммобилизованные на носителе пептиды представляют собой идеальный субстрат для последующих химических модификаций или ферментативных реакций, если таковые необходимы [47].

3. Ферментативное С-концевое ($^{16}O/^{18}O$) мечение белков.

Использование ^{18}O -атома в качестве метки известно еще с работ Spirson и Rittenberg [49], которые изучали механизм ингибирования продуктов реакции гидролиза амидной связи химотрипсином. Они обнаружили, что инкубация карбобензоксифенилаланина с химотрипсином в $H_2^{18}O$ воде приводит к включению изотопного атома в карбоксигруппу карбобензоксифенилаланина. При применении $^{18}O/^{16}O$ изотопного мечения получают химотриптические пептиды, меченные по С-концу не зависимо от их аминокислотной последовательности. Первое использование такого свойства в количественной протеомике описано Desidero и Kai [50]. Они осуществили ферментативное включение тяжелого изотопа атома ^{18}O в С-концевые аминокислотные остатки лейцин- и метионин-энкефалинов и использовали их в качестве внутреннего стандарта для количественного определения энкефалинов, выделенных из таламуса мыши.

Mirgorodskaya с соавторами [51] также использовали в своих работах протеолитическое расщепление с участием ^{18}O применительно к количественной протеомике. После выхода этой статьи Stewars, Tomson и Figeys [52] опубликовали данные, в которых говорилось более детально об условиях протеолитического расщепления с участием изотопа кислорода ^{18}O .

Обладая рядом преимуществ, такими как несложная химия и сдвиг массы на строго определенную величину, $^{18}O/^{16}O$ изотопное мечение стало мощным инструментом количественной протеомики. Однако, из-за слишком малой массовой разницы между изотопами (всего 2 Да) этот подход используется при наличии в лаборатории масс-спектрометров высокого разрешения.

В самом начале разработки этого метода было принято проводить протеолитическое расщепление белков в присутствии $H_2^{18}O$ [53]. Со временем условия изменились, и протеолиз стали проводить в обычной воде, а после лиофилизации смеси пептидов - растворять в буфере в $H_2^{18}O$. При этом, в присутствии трипсина два атома ^{18}O включаются на С-конце пептида. Протеолитическое ^{18}O мечение может быть разбито на два этапа [54]: на первом этапе проводится трипсинолиз в $H_2^{16}O$, а на втором этапе, после вакуумного выпаривания, проводится мечение пептидов с использованием $H_2^{18}O$. Условия для каждого из этапов в данном процессе могут быть оптимизированы независимо друг от друга.

Несмотря на высокую популярность в количественной протеомике, стандартизованного метода проведения реакции до сих пор не существует, и на сегодняшний день описано много протоколов [54-60] по условиям проведения ферментативной реакции, различающихся, главным образом, pH и содержанием солей кальция или органических растворителей, использованием иммобилизованного на носителе трипсина или в растворе. Однако, из экспериментальных данных известно, что проведение протеолитической реакции с трипсином в присутствии солей кальция увеличивает выход продуктов реакции [55]. Добавление к буферному раствору реакционной смеси ацетонитрила или DMSO также даёт положительный эффект. Группа Lopez-Ferre [55] установила, что в слабокислых условиях происходит незначительный обмен $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, и его можно снизить, если хранить образцы при температуре -20°C в H_2^{18}O воде после остановки реакции муравьиной кислотой.

Ещё одна сложность и неудобство, возникающее в ходе проведения меченя ^{18}O , - это вариабельность включения одного или двух атомов тяжелого изотопа кислорода в один пептид одновременно. Те же авторы [55] пишут, что хотя условия, которые они подобрали для данного метода, показывают высокую эффективность включения атомов изотопа кислорода, они не могли зарегистрировать включение в пептиды двух изотопов ^{18}O одновременно. Однако, в практике других экспериментальных работ такое явление наблюдалось. Например, Ong и Mann [61], Julka and Regnier [62], пишут о детекции вариабельного включения двух атомов кислорода в С-концевые аминокислотные остатки пептидов, что создавало неудобства и повышало степень ошибки при расчете отношений $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. Такое явление происходит из-за того, что первый атом кислорода заменяется в ходе гидролитической реакции фермента, а второй, может быть заменен в результате реакции разрыва и восстановления пептидной связи. В обычных для гидролиза условиях такая реакция происходит крайне медленно, из-за чего и возникают такие вариации в количестве пептидов с одним или двумя заменами легких изотопов атомов кислорода на их тяжелые аналоги. Сложность количественной оценки при таких условиях очевидна: при расчетах необходимо принимать во внимание 3 пика: во-первых, моноизотопический пик ^{16}O пептидов, во-вторых, моноизотопический пик пептидов с одним атомом ^{18}O , и, наконец, моноизотопический пик с двумя атомами ^{18}O . Картина усложняется еще и тем, что, например, величины m/z $^{18}\text{O}_1$ и $(^{16}\text{O}+2 \text{ Да})$ ионов будут одинаковы, также как и в случае $^{18}\text{O}_2$ m/z будет перекрываться с $(^{18}\text{O}_1+2 \text{ Да})$ и $(^{16}\text{O}+4 \text{ Да})$.

Решение этой проблемы лежит в разработке техники одноатомного или двуатомного ^{18}O -меченя. Естественно, для первого варианта необходимо решить проблему торможения реакции обмена между атомами $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$. Rao, Carruth и Miyagi [63] обнаружили, что при использовании Lys-C протеазы при $\text{pH} > 9,5$ происходит включение только одного атома кислорода, однако, механизм этой реакции остается пока неизвестен.

Для достижения максимальной эффективности по второму механизму – включение двух атомов изотопа кислорода – нужно решить вопрос об оптимизации условий, катализирующих обменную реакцию. По данным Zang с соавторами [56], выход пептидов, содержащих два атома тяжелого изотопа ^{18}O , намного выше, если реакцию трипсинолиза проводить при $\text{pH} 6,75$ в течение 20 часов. Staes et al. [60] сообщили о полном замещении двумя атомами ^{18}O в ходе инкубации при $\text{pH} 4,5$ в течение ночи.

Экспериментальные данные показывают, что несмотря на то, что в кислых условиях практически полностью блокируется амидазная активность, трипсин обладает некоторой карбоксикислород-обменной активностью. Последние опубликованные данные Hajkova et al. [64] говорят о том, что трипсин и Lys-C обладают pH оптимумами для амидазной и кислородообменной реакций в пределах pH 8-9 и pH 5-6 соответственно.

Другой способ повышения эффективности ^{18}O мечения – это иммобилизация трипсина [58, 65-66]. Преимущества данного подхода состоят в том, что иммобилизованный фермент позволяет с высокой точностью регулировать молярное соотношение субстрат/фермент и, таким образом, регулировать выход пептидов, меченых двумя изотопами атома кислорода. Другое достоинство иммобилизации трипсина заключается в том, что после проведения реакции продукты гидролиза отмываются, и поэтому вероятность обменной реакции между ^{18}O и ^{16}O атомами минимизируется.

Разница одноатомного и двуатомного изотопного мечения ^{18}O очевидна – 4 Да между ^{16}O и ^{18}O пептидами. Достижение полного двуатомного замещения позволит проводить количественную оценку и анализ по моноизотопическим пептидам ^{16}O и моноизотопическим пептидам ^{18}O , что позволит во многом избежать ошибок в расчётах.

4. ИЗОТОПНОЕ МЕЧЕНИЕ БЕЛКОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК SILAC.

4.1 SILAC с изотопными аминокислотами в среде.

SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture) – способ мечения аминокислотами со стабильными изотопами в культуре клеток (рис. 7). Стратегия SILAC состоит в том, что клетки млекопитающих, например, не способны синтезировать некоторые незаменимые аминокислоты. Это явление используется для обогащения питательных сред такими аминокислотами с изотопными атомами ^{15}N и ^{13}C , которые будут включаться в каждый новосинтезированный белок.



Рисунок 7.

Общая схема проведения эксперимента с применением технологии SILAC.

В работе Foster et al. [67] исследование проведено на культуре клеток HeLa, выращиваемых на среде DMEM с добавлением 10% сыворотки теленка. Питательная среда обогащена в одном случае нормальным лейцином $[\text{D}_0]\text{-Leu}$, а в другом - $[\text{D}_3]\text{-Leu}$, содержащим 3 атома дейтерия. Объектом исследования в данной работе являлись рафтовые белки мембран.

Shao-En Ong et al. [68] проводили включение $[D_3]$ -Leu в культуре клеток миобластов мыши для количественных измерений уровня экспрессии в процессе клеточной дифференцировки миобластов. Полное включение метки достигалось в среднем после пяти пассажей. Лейцин часто выбирается исследователями ввиду его распространенности среди других аминокислот в молекуле белка, кроме того, изотопная форма лейцина позволяет отличать его от изолейцина.

Schlosser et al. [69] использовали этот метод для поиска и идентификации фосфорилированных белков ядерной мембраны. Культуру клеток HeLa выращивали в присутствии изотопов $[^{13}C_6]$ -Arg и $[^{13}C_6]$ -Lys в питательной среде и индуктора фосфорилирования – перванадата натрия. Выбор этих аминокислот очевиден, ввиду особенностей структуры пептидов после расщепления трипсином. В результате после гидролиза можно было получить пептиды, оканчивающиеся ^{13}C аминокислотами на С-конце и изотопами ^{12}C , в качестве контроля. В части популяции контрольных культур также было индуцировано фосфорилирование для сравнения уровня фосфопротеинов в субкультурах. Фосфорилированные формы белков были экстрагированы из смешанных лизатов культур иммунопреципитацией фосфотирозин-специфичными антителами 4G10 и RC20. Элюированные с иммунного комплекса белки были разделены при помощи одномерного гель-электрофореза. Экстракт белков из геля анализировался LC-MS/MS (обращеннофазовой хроматографией в сочетании с tandemной масс-спектрометрией). Разница для фосфорилированных и нефосфорилированных однозарядных пептидов составляла 80 Да.

Для изотопно меченых образцов, массовая разница однозарядных пептидов в фосфорилированном состоянии и с одинаковым количеством фосфогрупп составляет 6 Да, а для пары пептидов с идентичной аминокислотной последовательностью, но в фосфорилированном или нефосфорилированном состоянии массовая разница составляет 80 Да. Пептиды из культуры клеток, меченых ^{13}C -аминокислотами, и пептиды из культуры клеток с ^{12}C -аминокислотами являлись по отношению друг к другу парой для расчета относительного количества фосфопротеинов. В дополнение к этому, в культуру клеток с изотоп-содержащими аминокислотами, через 12 часов после начала роста добавляли ингибиторы фосфотирозинфосфатазы - перванадат и молибдат натрия. Для количественной оценки отбирались только такие пептиды, разница в отношении которых достигала значительных величин, например, в пептидной паре *KIFEYETQR* это отношение составляло 3,5. Только для эмерина было найдено отношение между тяжелой и легкой цепями от 2,5 до 6,5, что нетипично большой разброс в величинах для SILAC.

Основным результатом всей этой работы стало установление факта, что эмерин является фосфопротеином, который играет ключевую роль в построении белковых комплексов в ядерной мембране. Правда, в сравнительных экспериментах с культурой клеток мыши, сайты фосфорилирования у мыши и человека различаются; но в большинстве случаев это отличие составляет сдвиг на одно положение аминокислотного остатка в направлении С-конца полипептидной цепи.

Надо отметить, что работа Schlosser и соавторов не единственный пример использования метода SILAC в количественной фосфопротеомике. Olsen et al. [70] исследовали изотопное мечение в культуре клеток для количественного анализа и определения сайтов фосфорилирования в белках клеток HeLa после воздействия эпидермальным фактором роста. Ученые идентифицировали в общей сложности 6600 сайтов фосфорилирования в 2244 белках. Одним из важнейших результатов работы стало прямое подтверждение того факта, что многие белки имеют больше одного сайта фосфорилирования, включая такие как белки убиквитинлигазы, факторы обмена гуанидиннуклеотидов и, как минимум, 46 факторов транскрипции.

4.2 SILAC с изотопными атомами $^{14}N/^{15}N$ в среде.

Группа Krijgsveld et al. [71] использовала изотопное мечение N^{15}/N^{14} белков многоклеточных эукариотических организмов – нематоды *Caenorhabditis elegans*

и мухи *Drosophila melanogaster*. Уникальность работы состоит в том, что в ходе экспериментов было достигнуто изотопное мечение практически всех белков организма *in vivo*. Понятно, что основной проблемой метаболического мечения является доступность метки для метаболических путей. В данном случае почти 100% эффективность достигалась в ходе двухэтапного эксперимента. Сначала на культуре, обогащенной ^{15}N , выращивали клетки *S. cerevisiae* и бактерии *E. coli*. Экстракт белков из лизированных клеток дрожжей и бактерий был разделен на двумерном электрофорезе и протестирован на изотопное распределение MALDI-TOF, показавший более 98% содержание тяжелых изотопов. На втором этапе, в питательные среды с нематодами *Caenorhabditis elegans* и дрозофилами *Drosophila melanogaster* в ряде поколений добавляли культуры дрожжей и *E. coli*, которые были выращены на средах с добавлением изотопов.

Для *Caenorhabditis elegans* сравнивались протеомы линии дикого типа, выращенной на среде с изотопно мечеными бактериальными клетками, и линии *glp-4*, характеризующейся тем, что у особей пролиферация половых клеток останавливается на ранней стадии. Равные количества особей обеих линий нематод были смешаны, лизированы и экстракт белков был разделен с использованием 2D электрофореза. Для исследования пятна из геля выбирались случайным образом. Так как равные количества культур были смешаны до белковой экстракции в соотношении близком к 1:1, но, естественно, не равном таковому, то необходимо было провести нормализацию для дальнейшего сравнения результатов. Эксперимент был повторен в обратном порядке, где тяжелыми изотопами были помечены нематоды линии *glp-4*. Ученые сравнивали количественное распределение 6 белков, связанных с репродуктивной системой нематод. В обоих экспериментах использовали одинаковый фактор нормализации и те же объемные и количественные соотношения.

Сравнение данных по обоим экспериментам показало, что среднее отношение составляет 0,98. Это говорит о высокой воспроизводимости эксперимента для всех анализируемых белков. В обоих экспериментах, прямом и реципрокном, исследователи смогли зафиксировать различия в количественном содержании интересующих белковых молекул от 1,4 до 7 раз.

Чтобы в очередной раз продемонстрировать преимущества данного метода, исследователи провели анализ с использованием жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS). В данном эксперименте было показано количественное содержание прогибита (фактор, обладающий анти-пролиферативной функцией; локализуется, в основном, в митохондриях) в 1,4 больше в линиях дикого типа по сравнению с мутантной линией, что полностью коррелировало с данными MALDI-TOF и иммуноблоттинга.

4.3 SILAC с изотопными атомами $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ в среде.

Everley et al. [72] использовали пару ^{12}C -Lys/ ^{13}C -Lys меченых лизинов в культуре клеток PC3M и PC3M-LN для идентификации белков, которые могут играть определенную роль в развитии рака простаты. Это первая работа, в которой изотопное мечение применялось для дальнейшего сравнения в двух разных культурах клеток. Понятно, что в разных линиях клеток уровень экспрессии одних и тех же белков будет в значительной степени отличаться друг от друга. В работе с использованием изотопного мечения в культуре было идентифицировано всего около 1000 белков, 444 из которых были оценены количественно. Примерно 30% всех проанализированных белков были оценены по одному пептиду, содержащему остаток лизина, а также по дополнительному пептиду, содержащему в своем составе остаток аргинина.

Следует остановиться на нескольких важных выводах из вышеприведенных работ по изотопному мечению в культуре клеток: во-первых, метаболическое изотопное мечение оказалось действительно применимо к количественному анализу; во-вторых, вариации и ошибки рутинной работы сводятся к минимуму; в-третьих, самое главное, это отсутствие необходимости в дальнейшей

химической дериватизации после экстракции белков. В-четвертых, это отсутствие необходимости очистки и выделения пептидов на колонке. В-пятых, SILAC проводит мечение около 50% всех триптических пептидов, тогда как ICAT, к примеру, только 20%. Далее, лизин встречается намного чаще в белках, чем цистеин, и здесь открывается возможность применения любых изотопных аминокислотных остатков. В заключение, можно добавить еще одно свидетельство в поддержку SILAC - метод обладает высокой степенью воспроизводимости.

5. МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ НА УРОВНЕ MS/MS. ITRAQ (ИЗОБАРНОЕ АМИНОМЕЧЕНИЕ).

iTRAQ (isobaric Tagging Reagents Amino-reactive Quantification) - элегантный метод, который позволяет довольно точно проводить количественный анализ сразу нескольких образцов (до четырех) на уровне MS/MS анализа. Его разработали Ross et al. [26] в 2004 году. Авторы синтезировали серию реагентов, идентичных по своей структуре, но различающихся по массе при MS/MS анализе. Изобарные метки связываются с N-концевым участком полипептидной цепи или ε-аминогруппы боковой цепи лизина. Получаемые меченые пептиды, дающие одинаковое значение величины m/z в MS спектрах, и идентичные по времени элюции с колонки, но в MS/MS анализе они сигнализируют через метки различной массы.

На рисунке 8 приведены основные характеристики этой метки: молекула представляет собой сигнальную группировку N-метилпиперазина массой от 114 до 117 Да, путем варьирования числа изотопов ^{13}C и ^{15}N в ней. Через карбонильную балансировочную группу массой от 28 до 31 Да (за счет различного числа атомов ^{18}O), комплекс с помощью N-гидроксисукцинимид, связанного через эфирную связь, соединяется с молекулой белка. Балансировочная группа поддерживает постоянство молекулярной массы меток в MS спектре, содержащих различное число изотопных атомов. Репортерная и балансировочная группировки представляют собой изобарный хвост.

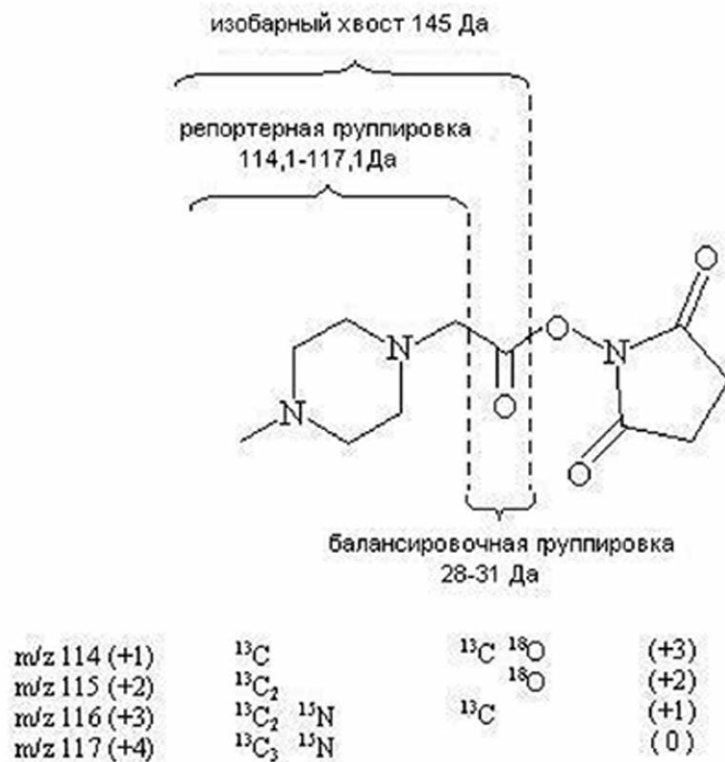


Рисунок 8.

Структурная формула изобарной изотопной метки.

Четыре образца метятся одним из вариантов изобарной метки, смешиваются в различных отношениях и анализируются по площади пиков m/z 114,1, 115,1, 116,1 и 117,1, которые соответствуют соотношению меченых белков. Надо также заметить, что район m/z 100 удобен еще и тем, что является наименее загрязненным побочными ионами. По массе сдвиг, наблюдаемый при MS/MS анализе, компенсируется балансирующей группой при MS анализе, так что номинальная масса каждого пептида остается неизменной в различных образцах, что значительно повышает чувствительность анализа. При использовании изобарной метки MS спектр пептидных ионов индивидуального белка проявляется в виде суммы всех MS спектров пептидных ионов данного белка всех образцов. Поскольку все они одинаковой массы, то расщепление сигнала ионов-предшественников и усложнение пептидной ионной картины для анализа не наблюдается. Один небольшой недостаток этого метода состоит в том, что для выявления различий в уровне экспрессии белков MS/MS спектры требуют больше времени обработки и анализа, чем MS спектры. При этом для использования этого метода необходимы масс-спектрометры типа Q-TOF.

Использование таких сигнальных ионов, описанных в данной работе, обеспечивает точный анализ данных, секвенирование пептидов и не усложняет спектр дополнительными пиками. Описанные здесь изобарные реагенты содержат N-метилпиперазин, благодаря которому пептиды приобретают полезные в использовании свойства. Циклические амины, в качестве пептидных дериватов упрощают интерпретацию MS/MS спектров [73,74]. Также было обнаружено, что эти метки ведут себя одинаково при ESI и MALDI ионизации, с той же тенденцией формирования b- и y-ионов – основных параметров, используемых при расшифровке последовательности пептидов.

В заключение можно сказать, что метод инкорпорирования изобарных меток не требует включения в работу дополнительных этапов. Используя четыре разновидности метки, можно проводить количественный анализ сразу нескольких образцов. Анализ уровня экспрессии тех или иных белков проходит при помощи тандемной MS/MS. При проведении мечения все MS спектры белков, меченых изобарными метками различной массы, складываются и не усложняют картину спектра, так как номинальная масса пептидов остается прежней. Изобарные метки не оказывают влияния на время элюции с хроматографической колонки.

6. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ БЕЛКОВ.

Посттрансляционные модификации – это направленное изменение структурных и функциональных свойств белковой молекулы путем присоединения различных простетических групп, протеолиза, или модификаций одной или нескольких аминокислотных остатков в её составе. Несмотря на большую важность этой проблемы, изучение таких белков весьма затруднено из-за отсутствия четко отработанных методов и техники. Многие посттрансляционные модификации были обнаружены случайно во время изучения индивидуальных белковых молекул с помощью стандартных методов молекулярной биологии [74, 75]. Введение в научную практику таких методов как химическая деградация по Эдману и масс-спектрометрия оказали неоценимую помощь в изучении модификаций белков.

Как известно, регуляция многих внутриклеточных процессов осуществляется за счет обратимого фосфорилирования белков. Исследование таких фосфорилированных комплексов и картирование сайтов фосфорилирования является важной проблемой в клеточной биологии и биомедицине. Для измерения степени фосфорилирования белков часто применяется изотоп ^{32}P . Для фосфопротеинов и фосфопептидов, присутствующих в клетке в очень малых концентрациях, необходима разработка технологии обогащения изотопами, чтобы избежать эффекта ионной супрессии, обусловленной присутствием большего количества нефосфорилированных форм белков и пептидов. Однако, посттрансляционные модификации белков не ограничиваются лишь процессами

фосфорилирования. Немалую роль играет О- и N-гликозилирование белковых молекул. Изучение и идентификация таких гликопротеинов представляет собой еще более сложную проблему ввиду гетерогенности структуры гликанов. Как и в случае с фосфопротеинами, низкие концентрации модифицированных белков на фоне больших концентраций немодифицированных молекул в значительной степени осложняет анализ вследствие подавления сигнала. Кроме того, один и тот же (глико)белок, экспрессируемый в различных клетках, может иметь различную структуру гликана, так как процесс гликозилирования тканеспецифичен.

Другие модификации, такие как присоединение гликозилфосфатидилинозитольных хвостов к белкам внеклеточного слоя плазматической мембраны, являются еще более редкими модификациями, по сравнению с фосфорилированием или гликозилированием. Тем не менее, такая модифицированная форма белка, представляет большой интерес и может быть выделена избирательным отщеплением гликозилфосфотидилинозитольного хвоста и экстракцией высвобожденного белка.

Энзиматическое связывание убиквитина к клеточными белками также представляет собой огромный интерес как одна из форм внутриклеточной модификации белков. Исследование такого рода модификации провели Peng et al. [29]; в данной работе убиквитин был замещен гистидиновым хвостом с последующей селективной очисткой на His-tag колонке и идентификацией белков.

Анализ модификаций белков обычно проводится методом сравнения экспериментальных данных с известной аминокислотной последовательностью. Поэтому, первый шаг, который должен быть сделан в этом направлении - точная идентификация белка с помощью антител или масс-спектрометрии. Двумерный электрофорез оказался хорошим инструментом в изучении и распознавании модифицированных белков. Например, фосфорилирование изменяет зарядное состояние белковой молекулы и, следовательно, ее электрофоретическая подвижность также претерпевает некоторые изменения. Каждое из таких пятен (2D-геля), содержащее модифицированные белки, может быть изучено в дальнейшем. В одном из таких экспериментов [76] было найдено более десяти различных модифицированных форм енолазы. По интенсивности пятен на окрашенном 2D-геле можно также получить информацию о соотношении модифицированных и немодифицированных белков.

После идентификации белка, картирование сайтов его модификации выполняется, как правило, по общей схеме. Белок подвергается протеолизу, так как пептиды более удобны для изучения, чем целые белковые молекулы. Смесь пептидов в дальнейшем анализируют с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра или ионной ловушки. Сама масс-спектрометрия не так давно пришла в фосфопротеомику. По статистике, 58% всех исследований фосфопротеинов приходится на 2001-2003 годы [77]. Для картирования сайтов фосфорилирования тандемная масс-спектрометрия была применена впервые в 1998 году [78].

Для получения более детальной информации о сайтах фосфорилирования, наряду с CID (Collision Ion Dissociation) в настоящее время широко используется метод ECD (Electron Capture Dissociation) [79], который девять лет назад был внедрен McLafferty. Уникальность метода заключается в том, что множественно-протонированные пептиды и белки захватывают электроны низкотермальной энергии, то есть электроны с низкой энергией (1-12 эВ). Захват термальных электронов протонированным пептидом является процессом экзотермическим и вызывает фрагментацию пептидного остова. ECD удобен тем, что в отличие от CID, фрагментация происходит вдоль всего пептидного скелета независимо от аминокислотной последовательности, при этом сохраняется нативность посттрансляционно модифицированных группировок пептидов.

Syka et al. [79] в своих исследованиях сайтов фосфорилирования в пептидах, применяли несколько модифицированную версию ECD –

ETD (Electron Transfer Dissociation). Технология основана на ион-ионной реакции множественно протонированных пептидов с однозарядными анионами в квадрупольной линейной ловушке.

В данном разделе обзора мы рассмотрим некоторые формы посттрансляционных модификаций и сложности в их изучении. В количественной оценке модифицированных белков часто используются методы, описанные ранее. Основное отличие их состоит в адаптированности и направленности на связывание с небелковыми группировками, которые появляются в результате посттрансляционных модификаций белков.

6.1 Фосфопротеомика.

6.1.1 IMAC – металл-аффинная хроматография.

Изучение процесса фосфорилирования белков и картирование таких сайтов является важной составной частью клеточной биологии в исследованиях внутриклеточной сигнализации. В протеомике исследование фосфорилированных форм белков встречает на своем пути множество трудностей. Huang et al. [80] осуществляли количественный анализ фосфопротеинов с применением метода IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) – сочетания изотопного диметильного мечения с металл-аффинной хроматографией. Модельными белками для исследования служили альфа- и бета-казеин. Диметильное изотопное мечение было выбрано по нескольким причинам: во-первых, оно быстрое; во-вторых, происходит мечение пептидов по фосфорилированным аминокислотным остаткам; в-третьих, такое изотопное мечение не влияет на время удержания пептидов на колонке, то есть изотопный эффект отсутствует.

Экстракт белковой массы получали из матки беременной крысы. Белки гомогената ткани подвергались восстановлению по остаткам цистеина с последующим алкилированием в денатурирующем буфере. Модифицированные белки очищали на IMAC колонке с иммобилизованными ионами Fe(III) и подвергали протеолитическому расщеплению трипсином. Пептиды смешивали с 4% [D₀]- или [D₂]-формальдегидом и затем с цианоборгидридом. Меченые пептиды были смешаны в различных соотношениях: 1:1, 1:2, 1:5 и 1:10. Пептиды, меченые изотопами, очищали на колонке IMAC, уравновешенной 0,1% уксусной кислотой. Пептиды элюировали ацетонитрилом и гидроксидом аммония в уксусной кислоте (pH 9,5) и в дальнейшем анализировали с использованием MALDI-TOF или ESI-LC-MS/MS.

Другие исследователи [81] применяли галлий вместо железа на колонке IMAC, так как, по словам авторов, ионы галлия оказались более селективны к фосфопептидам, чем широко распространенные IMAC на основе железа или алюминия. Процент нефосфорилированных пептидов на фоне элюированных с колонки фосфор-содержащих пептидных компонентов составлял всего 2%. При этом, после элюции образец может быть напрямую анализирован MALDI или методом электростатического распыления.

Для выделения именно фосфопротеинов IMAC оказался очень удобен. MALDI анализ показал, что фосфорилированных форм среди белков, не прошедших IMAC стадию очистки, зафиксировано не было. Наличие в спектре фосфорилированных пептидов было подтверждено анализом спектров тех же пептидов, но инкубированных с щелочной фосфатазой [80].

В сумме, метод диметильного мечения в сочетании с IMAC в большей степени подходит для изучения фосфопротеинов. Возможно внедрение некоторых модификаций в этот процесс для снижения возможных неспецифических связываний: например, сочетание диметильного изотопного мечения с эстерификацией, или использование Glu-C вместо трипсина, чтобы сократить число карбоксильных группировок в единичном пептиде [80-82]. Безусловно, одним из недостатков этого метода является связывание с иммобилизованными ионами металла не только отрицательно заряженных фосфатных группировок, но и всех кислых пептидов. Эта проблема была в значительной степени решена после того, как Ficarro et al. [82] стали переводить карбоксигруппы в метильные эфиры.

6.1.2 Метод без использования изотопной метки. Мультипротеазный подход.

Для идентификации сайтов фосфорилирования в белках внутренней ядерной мембраны, Schlosser et al. [69] использовали два подхода: мультипротеазный, в котором белки субклеточных фракций из клеток линии N2a мыши смешивали, разделяли электрофоретически и затем подвергали гидролитическому расщеплению различными протеазами, и SILAC, в котором в среду культуры клеток HeLa добавляли тяжелые или легкие изотопные формы лизина и аргинина. В обоих случаях также применяли высокоспецифичный ингибитор тирозинфосфатазы VtPy , способный проникать через клеточную мембрану. Ингибитор фосфатазы, как и ингибитор протеинкиназы, стауроспорин, в сочетании с ванадатом и молибдатом натрия добавляли перед гомогенизацией клеток. Таким образом, ингибиторы тирозинфосфатазы и протеинкиназы помогают предотвратить изменения фосфорилированных белков после гомогенизации клеток. Гомогенат контрольного и исследуемого образцов параллельно разделенном на двух гелях, один из которых был перенесен на нитроцеллюлозную мембрану с последующим иммуноокрашиванием фосфотирозин-специфичными антителами PY99. Однако, при окрашивании обоих образцов, уровень интенсивности фосфотирозиновых белков в исследуемом образце незначительно отличался от контрольного. Область геля, соответствующая наибольшей интенсивности окрашивания иммуноблота вырезали, и белки подвергали гидролитическому расщеплению в геле различными протеазами: трипсином, эластазой, протеиназой K и термолизином. Все четыре смеси пептидов были обогащены на наноколоне с титановыми сферами и проанализированы с использованием nanoLC-MS/MS. В обоих образцах (с наибольшей фосфотирозиновой активностью и контрольном образце) было идентифицировано четыре белка. В первом – изоформа LAP 2-гамма и эмерин, а во втором – нуклеофосмин-1, катион-зависимый рецептор маннозо-6-фосфат и эмерин. В первом образце не было идентифицировано ни одного фосфотирозинового пептида, хотя в нем содержались белки, соответствующие большей интенсивности окрашивания по иммуноблоту. Фосфотирозиновые аминокислотные остатки были идентифицированы только в эмерине.

Авторы предлагают следующее объяснение такому явлению: возможно, что в смеси содержалось малое, недостаточное, количество пептидов с фосфорилированным тирозином на общем фоне белков. Также, возможно влияние неспецифических реакции фосфотирозиновых антител. И, наконец, влияние со стороны колоночного носителя с титановыми сферами, который обладает хорошей аффинностью к фосфопептидам, но, вместе с тем, иногда наблюдалась коэлюция и нефосфорилированных пептидов с низкой величиной rI .

6.2 Гликопротеомика.

Достижения в гликопротеомике до сих пор остаются ничтожно малыми, несмотря на существующее в наши дни понимание самого процесса гликозилирования и его значимости. Положение осложняется, прежде всего, обширностью форм гликанов, их структурным разнообразием, а также тканеспецифичностью процесса гликозилирования. Структурные исследования гликоконъюгатов млекопитающих проводятся, в основном, методами гистохимии или с помощью моноклональных антител [83,84]. Результаты таких подходов могут дать информацию о наличии или отсутствии гликоконъюгатов в клетке, однако с помощью этих методов почти невозможно сказать является ли этот конъюгат гликолипидом или N- или O-гликопротеином, кроме того, такие методы не обеспечивают детальной и точной информации о структуре самого гликана.

Для определения природы самого гликана и сайта гликозилирования часто используют технологию IGOT (Isotope coded Glycosylation-site-specific Tagging). Суть метода заключается в следующем: гидролиз гликопептидов пептидил-N-гликозидазой F проводят в присутствии H_2^{18}O , во время которого происходит включение ^{18}O изотопа в каждый N-гликозилированный участок пептида.

Ещё более сложная ситуация складывается с О-гликопептидами, поскольку универсальной гликозидазы для гликанов с данным типом связи не существует.

В наши дни широкое применение в гликопротеомике нашли лектины. Большинство лектинов – гликопротеины. В зависимости от источника различают фитолектины, миколектины, зоолектины. Это сложные молекулы, в составе которых может быть до 20 субъединиц белковой природы и часто ионы Ca^{2+} или Mn^{2+} . Уникальность лектинов заключается в их способности распознавать и связываться с углеводными компонентами: глюкозой, маннозой, сахарозой и т.д. Именно свойство избирательного связывания с гликопротеинами и полисахаридами стало основным для использования лектинов в аффинной хроматографии.

Аффинную хроматографию с лектинами обычно проводят в две стадии: сначала для выделения нативных гликопротеинов, а затем, после проведения трипсинолиза выделенных на первой стадии белков, проводят вторую хроматографию с целью выделения пептидов, содержащих гликановую группировку. Кроме того, данный вид хроматографии применяется в гликопротеомике с еще одной важной целью: с помощью лектинов можно выяснить с каким энантиомером, диастереомером, аномером, с каким видом связи (1-3/1-4) имеет дело исследователь.

6.2.1 Дериватизация и изотопное мечение $[\text{D}_3]$ -аргинином.

Uematsu et al. [85] предлагают свой подход в гликопротеомике, используя в качестве модельных объектов дерму и эпидермис мыши, для качественной и количественной характеристики N-гликозилированных белков ткани. С этой целью специально была разработана новая техника изотопной гликодериватизации. Авторы синтезировали новые изотопные метки, ковалентно связывающиеся с белками, и очень хорошо ионизируемые: N-((Вос-аминоокси)ацетил)триптофаниларгинина метиловый эфир гидрохлорид, N-((аминоокси)ацетил(триптофаниларгинина метиловый эфир гидрохлорид (aoWR(H)) и $[\text{D}_3]$ -аргинина метиловый эфир гидрохлорид (aoWR(D_3)). Образцы тканей эпидермиса были обезжирены, лиофилизированы, затем восстановлены по остаткам цистеинов и S-карбамоилметилованы в денатурирующих условиях. Дегликозилирование проводилось пептидил-N-гликозидазой F. Леофилизованную смесь пептидов растворяли в аликвоте aoWR(H) и aoWR(D_3) и инкубировали при 90°C в течение часа. Эти же самые образцы для сравнительного эксперимента дериватизировали 2-аминопурином, как было ранее предложено в аналогичных работах [86-88].

Каждый образец дериватизированный aoWR(H) и aoWR(D_3) проанализировали с использованием MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight).

Значение включения aoWR(H) и aoWR(D_3) состоит в том, что N-конец пептида используется для вставки оксиламиновой функциональной группы, а С-конец служит для формирования дейтерированных аналогов метильных эфиров. MALDI-TOF/TOF анализ aoWR(H) и aoWR(D_3) дериватов исследуемых олигосахаридов дает сигнал высокой интенсивности на уровне m/z 431 и 434, который соответствует разрыву связи N-O в гликопептидах. Разница масс между aoWR(H) и aoWR(D_3) производными олигосахаридами составляет 3 Да, что обеспечивает эффективное относительное количественное измерение распределения N-гликанов. Особое внимание исследователей привлекали гликопротеины, несущие маннозные олигосахариды. Для их очистки и выделения из общей смеси белков применяли конканавалин А, который обладает аффинностью к маннозе. Затем, конканавалин А-связанные трипсинолизированные пептидные фрагменты были разделены обращеннофазовой хроматографией. Для достоверности данных также проводился анализ образцов, обработанных предварительно пептид-N-гликозидазой F. Так, например, на спектрах всегда проявлялось характерное распределение сигналов с разницей в 162 Да (гексоза) для одного и того же пептида, связанного со структурно различными гликанами, содержащими маннозу.

После ферментативного гидролиза оставался лишь один сигнал, соответствующий массе аминокислотной цепи пептида. Авторы также обнаружили, что гликопептины с различными формами гликана на одном и том же аминокислотном остове, различаются по времени задержки на колонке и элюции при обращеннофазовой хроматографии. Пептиды, модифицированные более крупными стерическими N-гликанами, элюируются раньше, чем с меньшими N-гликанами.

В общей сложности исследователями было обнаружено 15 гликопротеинов, 4 из которых являются трансмембранными белками. Нетрансмембранные белки принадлежали либо лизосомам, либо внеклеточному матриксу.

В заключение можно еще раз отметить основные качества этого метода. Во-первых, данные изотопные метки позволяют проводить количественные измерения в протеоме гликопротеинов быстро и с высокой чувствительностью. Во-вторых, из-за высокой ионизируемости, данные химические дериваты могут быть избирательно детектированы с минимальным набором этапов для дополнительной очистки. В-третьих, эффективность метода дериватизации позволяет сравнивать белковый профиль как между различными тканевыми образцами (дерма и эпидермис), так и на уровне одного образца между различными субклеточными органеллами.

6.2.2 Твердофазное изотопное мечение (SIT).

Принципы твердофазного изотопного мечения оказались применимы также и для количественных исследований в гликопротеомике. Hui Zhang et al. [48] описали метод для количественных измерений N-гликопротеинов, основанный на ковалентной сшивке белков с подложкой, используя для этой цели гидразин, изотопном мечении иммобилизованных гликопротеинов и расщеплении на пептиды с последующим отрывом от твердой фазы при участии пептид-N-гликозидазы F.

Собственно метод состоит из шести этапов: сначала, гликопротеины проходят обработку периодатом, при которой цис-диолы углеводной группы переходят в альдегиды, что является необходимым условием для проведения реакции с гидразинами, иммобилизованными на твердой подложке. В результате реакции формируется ковалентная гидразиновая связь и белки становятся пространственно фиксированными, а несвязавшиеся негликозилированные белки на втором этапе отмываются при промывке. На третьем этапе: иммобилизованные на твердой фазе гликопротеины обрабатывают пептидил-N-гликозидазой F. Далее следует собственно изотопное мечение $[D_0]$ - или $[D_4]$ -янтарным ангидридом аминокислотной боковой цепи лизина. После проведения изотопного мечения, N-гликопептиды элюируются с твердой фазы при помощи пептидил-N-гликозидазы F. Образцы анализируются LC-MS/MS или MALDI.

Метод позволяет проводить идентификацию и количественный анализ N-гликопротеинов и определять сайты гликозилирования в белках. Избирательность метода позволяет использовать его для анализа таких образцов, как клеточные мембраны, тканевые жидкости и секретируемые белки, которые в большой степени обогащены гликанами. Метод также позволяет упростить анализируемую смесь, так как белки, как правило, содержат немного сайтов гликозилирования. Также необходимо отметить, что данный метод может быть с небольшими изменениями адаптирован для анализа O-гликопротеинов.

6.2.3 Метод без использования изотопной метки. Изучение O-сульфатированных форм серина и треонина.

Сульфатирование – еще один вид посттрансляционных модификаций, который привлек внимание исследователей в области протеомики. Этот вид белковой модификации представлен во всех видах эукариот, начиная с простейших представителей и оканчивая человеком. Сульфатирование довольно распространенный процесс ферментативной модификации в организмах, который направлен и на белки и на углеводные компоненты, а также на ксенобиотики [89]. Процесс протекает с участием единственного известного в клетке донора

сульфогруппы – 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфата (ФАФС) [90] и может осуществляться с образованием различных видов связей: эфирной (О-сульфатирование), амидной (N-сульфатирование) и тиоэфирной (S-сульфатирование). О-сульфатирование, перенос сульфатной группы на гидроксильную группу или фенольный акцептор превалирует в клетке. Большая часть клеточного сульфатирования приходится на полисахариды, стероиды, катехоламины и тиреоидные гормоны. Многие сульфопроизводные белков не могут регулировать экспрессию собственных генов. Кроме того, время полужизни сульфопроизводных намного меньше, чем других производных.

Исследование данного вида модификаций хорошо описано в работе Medzihradszky et al. [91]. Детекция и описание такого вида посттрансляционных модификаций были проведены с использованием жидкостной хроматографии с последующим анализом тандемной масс-спектрометрией. Авторы приводят структурную характеристику О-сульфатированных сериновых и треониновых аминокислотных остатков в белковой молекуле. Объектом исследования служили белки из эволюционно различных классов животных: нейронального промежуточного филамента и легкой цепи миозина моллюсков *Lymnaea stagnalis*, катепсин-С-подобный белок из малярийного паразита *Plasmodium falciparum*, и рецепторная тирозинкиназа Ror2 человека.

С использованием LC-ESI-CID-MS (Liquid Chromatography Electro Spray Ionization Collision Induced Dissociation Mass Spectrometry) анализа было обнаружено, что некоторые компоненты пептидной смеси после трипсинолиза имеют одинаковую массу, но при элюции различаются по времени удержания на колонке от 1 до 5 минут и имеют различия в заряде иона. Тщательный LC-ESI-CID-MS анализ показал семь таких пептидов в одном из образцов промежуточного филамента. Для более детального исследования авторы сопоставили профиль хроматографической элюции модифицированных пептидов и их немодифицированных аналогов с данным LC-MS анализа. На основании полученных результатов был сделан вывод, что исследователи выделили несколько модифицированных аналогов, имеющих идентичную аминокислотную последовательность, различающуюся на 80 Да. Эти модифицированные аналоги стабильны в ESI условиях и потери массы составляют именно 80 Да, что также подтверждает наличие сульфогруппы в пептидах.

В качестве основного результата можно указать на то, что авторы статьи обнаружили сульфатирование белков по сериновому и треониновому аминокислотным остаткам - одну из природных форм посттрансляционных модификаций. Показана характеристика сульфо-алифатических пептидов, которая позволяет различать их от фосфорилированных аналогов. Результаты работы свидетельствуют о том, что сульфатирование серина или треонина более стабильно, чем сульфатирование тирозина.

6.2.4 Фронтальная аффинная хроматография (FAC).

Это количественный вид аффинной хроматографии, который был разработан Kasai и Ishii [92] около 30 лет назад. FAC (Frontal Affinity Chromatography) позволяет точно определить величину K_d биомолекул. FAC использовали в исследовании антигенов и антител, протеаз и их субстратных аналогов, а также лектинов и гликопротеинов. “Старая” технология FAC занимала много времени для каждого анализа, требовала немалое количество лиганда для иммобилизации на колонку исследуемого образца для элюции.

Однако несколько лет назад Hindsgaul [93] смог преодолеть все эти трудности, смонтировав тонкую колонку (0,75 мм × 150 мм) с иммобилизованным холерным токсином. Самая главная инновация в этом – это соединения этой колонки с масс-спектрометром, что позволило анализировать MS спектры олигосахаридных производных в режиме реального времени. Такой метод получил название FAC/MS.

Hirabayashi с соавторами [94] внесли свои изменения в эту систему, сделав её более точной и специализированной на лектин-олигосахаридном взаимодействии. Авторы использовали флуоресцентную детекцию (FD – Fluorescence Detection) и их метод – FD/FAC - может в короткий срок определить более ста олигосахаридов.

Развитие FD/FAC стало необходимо для повышения эффективности существующих систем анализа олигосахаридов. На сегодняшний день, в FD/FAC используются колонки капсульного типа (2×10 мм) по две и больше в параллели, что позволяет проанализировать более 100 олигосахаридов за сравнительно короткое время.

Ранее разработанный метод Hase et al. [95] пиридиламинирования обладает рядом недостатков по сравнению с FD/FAC, таких как химическая нестабильность флуоресцентной метки, более низкая чувствительность, но хорошее разделение в системах HPLC.

7. АБСОЛЮТНЫЙ КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ И ФОСФОПРОТЕИНОВ МЕТОДОМ ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ.

Метод AQUA (Absolute Quantification) уникален тем, что его разработчики [96] предлагают абсолютный количественный анализ белков в протеоме. Все рассматриваемые в настоящем обзоре методы, позволяют проводить относительную количественную оценку белков в силу ограниченности возможностей техники масс-спектрометрии для количественных оценок. Gerber с соавторами [96] предлагают технически несложный метод оценки абсолютного количества белков и их модифицированных форм, в частности, фосфопротеинов. В данной работе авторы применяли этот метод для абсолютной количественной оценки двух регуляторных белков Sir2 и Sir4 (вовлеченных в деацетилирование гистонов) из культуры клеток дрожжей, человеческих сепараз Ser-1126, Ser-1501, а также лошадиного миоглобина.

Для осуществления этой методики была разработана следующая стратегия: синтезировались пептиды в качестве внутренних стандартов, которые в точности повторяли бы идентифицированные по MS/MS спектрам пептиды интересующих белков. Причем, синтез пептидов проводили с использованием стабильных изотопных меток ^{13}C и ^{15}N , которые включались в пептид. Также, можно синтезировать пептиды с ковалентными модификациями, типа фосфорилирования, метилирования или ацилирования, что соответствовало бы посттрансляционным модификациям, встречающимся в клетках. Такие синтетические пептиды затем используются как внутренние стандарты для точной абсолютной оценки и измерений содержания белков и их модифицированных вариантов после протеолитического расщепления.

При твердофазном синтезе пептидов включался лейцин, содержащий шесть атомов ^{13}C и один атом ^{15}N . В результате были получены химически абсолютно идентичные пептиды, которые при MS анализе были легко отличимы от нативных изотопных форм массовым сдвигом в 7 Да. Синтетические пептиды сравнивали с нативными по таким параметрам, как время элюции с колонки, эффективность ионизации и степень фрагментации.

Перед самым анализом клеточный лизат, содержащий от 300 аМ до 30 пМ миоглобина, разделяли при помощи одномерного SDS электрофореза, интересующие полосы вырезали и проводили протеолиз белков в геле в присутствии 500 пМ синтетических AQUA пептидов с последующей жидкостной обращеннофазовой хроматографией. Для клеточного лизата из $1,8 \times 10^7$ клеток трипсинолиз проводили в присутствии 150 фМ AQUA пептидов, при анализе человеческого Ser-1126 – 100 пМ и 150 пМ двух разных синтетических пептидов, для Ser-1501 – 200 фМ пептидов. Характер элюции и фрагментация таких пептидов в MS/MS анализе оказались абсолютно идентичны нативным пептидам исследуемых белковых молекул.

Абсолютное количество исследуемых белков может быть затем определено довольно точно благодаря тому, что известно какое количество внутренних стандартов добавляли в реакцию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В наши дни количественный анализ с применением tandemной масс-спектрометрии занял особое место в системной биологии. Уже сейчас известно немало работ по белок-белковым, белок-пептидным взаимодействиям, выявленных с помощью этого метода. Масс-спектрометрические методы помогли исследователям получить ответы на такие важные вопросы, как изучение динамики распределения различных посттрансляционных форм белков, их субклеточной локализации, локализации процессов комплексообразования.

Такие области количественной протеомики, как гликопротеомика и фосфопротеомика учитывают различные вариации белковых молекул на уровне посттрансляционных модификаций. Одним из важнейших прикладных и фундаментальных применений количественной протеомики стала протеомика органелл. Информация о количественном содержании тех или иных белковых молекул в различных органеллах, их сочетании и динамическом распределении в клетке и организме, вызванном как ответная реакция клетки на различные внешние факторы, естественные физиологические циркуляции белков между органеллами – все это дает возможность принципиально нового взгляда и понимания механизмов клеточной дифференциации, сигнализации, транспорта, секреции белков и множества других процессов клеточного жизненного цикла.

Масс-спектрометрия стала все больше преобладать в изучении белковых взаимодействий, отесняя классическую дигибридную систему. В отличие от дигибридной системы, методами протеомики можно исследовать сложные комплексы взаимодействующих молекул. Однако, ввиду того, что многие взаимодействия характеризуются невысокой аффинностью, есть вероятность зафиксировать при помощи масс-спектрометрии ложные сигналы, предполагающие наличие связи между молекулами. Избежать таких ложнопозитивных сигналов можно с применением кросс-линкеров, стабилизирующих слабые связи с белком.

Количественная протеомика на основе масс-спектрометрии - это мощный инструмент развития биологии, медицины, диагностики, структурной биологии и т.д. Однако, как и любой другой метод, масс-спектрометрия тоже обладает некоторыми ограничениями возможностей. Количественная оценка белков с низкой концентрацией в клетке на фоне белков с высокой концентрацией представляет собой определенную методическую сложность, которую непросто преодолеть. До сих пор, также трудно провести количественный анализ в масштабе целого протеома. Проведение количественного анализа абсолютного содержания какого-либо из компонентов пока еще представляет сложность, но уже сейчас находятся пути выхода из этого положения. Тем не менее, несмотря на все эти ограничения, количественная протеомика уже сейчас принесла много полезного науке и нашла свое применение как в фундаментальной, так и в прикладной сферах.

Работа поддержана грантом РФФИ №07-04-00803а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tonge R., Shaw J., Middleton B., Rowlinson R., Rayner S., Young J., Pognan F., Hawkins E., Currie I., Davison M. (2001) *Proteomics*, **1**, 377-396.
2. Patton W.F. (2002) *J. Chromatography B*, **771**, 3-31.
3. Gade D., Thiermann J., Markowsky D., Rabus R.J. (2003) *Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **5**, 240-251.
4. Ottens A.K., Kobeissy F.H., Wolper R.A., Haskins W.E., Hayes R.L., Denslow N.D., Wang K.K.W. (2005) *Anal. Chem.*, **5**, 4836-4845.
5. Unlu M., Morgan E., Minden J.S. (1997) *Electrophoresis*, **18**, 2071-2077.
6. Freeman W.M., Hemby S.E. (2004) *Neurochem. Res.*, **29**, 1065-1089.

7. *Alban A., David S.O., Bjorkesten L., Andersson C., Sloge E., Lewis S., Currie I.* (2003) *Proteomics*, **3**, 36-44.
8. *Rabilloud T.* (2002) *Proteomics*, **2**(1), 3-10.
9. *Hoffmann P., Ji H., Mortiz R.L., Connolly L.M., Frecklington D.F., Layton M.J., Edes J.S., Simpson R.J.* (2001) *Proteomics*, **1**, 807-818.
10. *Lubman D.M., Kachman M.T., Wang H., Gong S., Yan F., Hamler R.L., O'Neil K.A., Zhu K., Buchanan N.S., Barder T.J.* (2002) *J. Chromatogr. B*, **???**, 183-196.
11. *Hamler R.L., Zhu K., Buchanan N.S., Kreunin P., Kachman M.T., Miller F.R., Lubman D.M.* (2004) *Proteomics*, **4**, 562-577.
12. *Wang H.X., Kachman M.T., Schwatz D.R., Cho K.R., Lubman D.M.* (2004) *Proteomics*, **4**, 2476-2495.
13. *Opitek G.J., Ramirez S.M., Jorgenson J.W., Moseley M.A.* (1998) *Anal. Biochem.*, **258**, 349-361.
14. *Chong B.E., Yan F., Lubman D.M., Miller F.R.* (2001) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 291-296.
15. *Zhang Z.L., Smith D.L., Smith J.B.* (2001) *Proteomics*, **1**, 1001-1009.
16. *Lubman D.M., Kachman M.T., Wang H., Gong S., Yan F., Hamler R.L., O'Neil K.A., Zhu K., Buchanan N.S., Barder T.J.* (2002) *J. Chromatogr. B*, **???**, 183-196.
17. *Zhu K., Kachman M.T., Miller F.R., Lubman D.M., Zhang R.* (2004) *J. Chromatogr. A*, **1053**, 133-142.
18. *Feng B.B., Patel A.H., Keller P.M., Slemmon J.R.* (2001) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 821-826.
19. *Krapfenbauer K., Fountoulakis M., Lubec G.* (2003) *Electrophoresis*, **24**, 1847-1870.
20. *El Rassi Z., Horvath C.* (1986) *J. Chromatogr. B*, **359**, 255-264.
21. *Gerber S.A., Rush J., Stemman O., Kirschner M.W., Gygi S.P.* (2003) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **100**, 12, 6940-6945.
22. *Oda Y., Huang K., Cross F.R., Cowburn D., Chait B.T.* (1999) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **96**, 6591-6596.
23. *Gygi S.P., Rist B., Gerber S.A., Turecek F., Gelb M.H., Aebersold R.* (1999) *Nat. Biotechnol.*, **17**, 994-999.
24. *Wang S., Regnier F.E.* (2001) *J. Chromatogr. A*, **924**, 345-357.
25. *Flory M.R., Griffin T.J., Martin D., Aebersold R.* (2002) *Trends in Biotechnology*, **20**(12), S23-S29.
26. *Ross P.L., Huang Y.N., Marcheset J.N., Williamson B., Parker K., Hattan S., Khainivski N., Pillai S., Subhakar D.* (2004) *Mol. Cell. Proteomics*, **3**(12), 1154-1169.
27. *Jenkins R.E., Kitteringham N.R., Hunter C.L., Webb S., Hunt T.J., Elsbey R., Watson R.B., Williams D., Pennington S.R., Park K.B.* (2006) *Proteomics*, **6**, 1934-1947.
28. *Aebersold R., Mann M.* (2003) *Nature*, **422**, 198-207.
29. *Peng J., Gygi S.P.* (2001) *J. Mass Spectrom.*, **36**, 1083-1091.
30. *Leither A., Linder W.* (2006) *Proteomics*, **6**, 5418-5434.
31. *Hansen K.C., Schmitt-Ulms G., Chakley F., Hirsch ?.* (2003) *J. Mol. Cell. Proteomics*, **2**, 299-314.
32. *Li J., Steen H., Gygi S.P.* (2003) *J. Mol. Cell. Proteomics*, **2**, 1198-1204.
33. *Oda Y., Owa T., Sato T., Boucher B.* (2003) *Anal. Chem.*, **75**, 2159-2165.
34. *Yu L.-R., Conrads T.P., Uo T., Isaaq H.J.* (2004) *J. Proteome Res.*, **3**, 469-477.
35. *Parker K.C., Pattern D., Williamson B., Marches J.* (2004) *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, 625-659.
36. *Molloy M.P., Donohoe S., Brzezinski E.E., Kilby G.W.* (2005) *Proteomics*, **5**, 1204-1208.
37. *Sethuraman M., McComb M.E., Huanh H., Huang S.* (2004) *J. Proteome Res.*, **3**, 1228-1233.
38. *Sethuraman M., McComb M.E., Heibeck T., Costello C.E., Cohen R.A.* (2004) *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, 273-278.

39. Dunkley T.P.J., Watson R., Griffin J.L., Dupree P., Lilley K.S. (2004) *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, 1128-1134;
40. Li K.W., Hornshaw M.P., van Minnen J., Smalla K.-H. (2005) *Proteome Res.*, **4**, 725-733.
41. Jiang X.-S., Dai J., Sheng Q.-H., Zhang L. (2005) *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 12-34.
42. Ranish J.A., Yi E.C., Leslie D.M., Purvine S.O., Goodlet D.R., Eng J., Aebersold R. (2003) *Nature Genetics*, 18 february published on line; doi:10.1038/ng1101.
43. Shen M., Guo L., Wallace A., Fitzner J., Eisenman J., Jacobson E., Jhonson R.S. (2003) *Mol. Cell. Proteomics*, **2**, 315-324.
44. Wang S., Regnier F.E. (2001) *J. Chromatogr. A*, **924**, 345-357.
45. Warwood S., Mohammed S., Cristea I.M., Evans C., Whetton A.D., Gaskell S.J. (2006) *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **20**, 3245-3256.
46. van Hoang M., Conrads T.M., Veestra T.D., Bonder J., Terunuma A., Vogel J.C., Fisher R.J. (2003) *J. Biomolec. Technol.*, **14**(3), 216-223.
47. Zhou H., Ranish J.A., Watts J.D., Aebersold R. (2002) *Nature Biotechnology*, **19**, 512-515.
48. Zhang H., Li X.-J., Martin D.B., Aebersold R. (2003) *Nature Biotechnology*, **21**(6), 660-666.
49. Spirson D.B., Rittenberg D. (1951) *Nature*, **167**, 484-484.
50. Desidero D.M., Kai M. (1983) *Biomed. Mass Spectrom.*, **10**, 471-479.
51. Mirgorodskaya O.A., Kozmin Y.P., Titov M.I., Korner R., Sonksen C.P., Roepstorff P. (2000) *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **14**, 1226-1232.
52. Stewart I.I., Thomson T., Figeys D. (2001) *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **15**, 2456-2465.
53. Yao X., Freas A., Ramirez J., Dmitriev P.A., Fenselau C. (2001) *Anal. Chem.*, **73**, 2836-2842.
54. Yao X., Afonso C., Fenselau C. (2003) *J. Proteome Res.*, **2**, 147-152.
55. Lopez-Ferrer D., Ramos-Fernandes A., Martinez-Bartolome S., Garcia-Ruiz P., Vasquez J. (2006) *Proteomics*, **6**, S4-S11.
56. Zang L., Palmer T.D., Hancock W.S., Sgroi D.C., Karger B.L. (2004) *J. Proteome Res.*, **3**, 604-612.
57. Heller M., Mattou H., Menzel C., Yao X. (2003) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **14**, 704-718.
58. Qian W.J., Monroe M.E., Liu T., Jacobs J.M. (2005) *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 700-709.
59. Bantscheff M., Dimpfelfeld B., Kuster B. (2004) *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **18**, 869-876.
60. Staes A., Demol H., Van Damm J., Martens L. (2004) *J. Proteome Res.*, **3**, 786-791.
61. Ong S.-E., Mann M. (2005) *Nature Chem. Biology*, **1**(5), 252-262.
62. Julka S., Regnier F.E. (2004) *J. Proteome Res.*, **3**, 350-363.
63. Rao K.S.C., Carruth R.T., Miyagi M. (2005) *J. Proteome Res.*, **4**, 507-514.
64. Hajkova D., Rao K.S.C., Miyagi M. (2006) *J. Proteome. Res.*, **5**, 1667-1673.
65. Brown K.J., Fenselau C. (2004) *J. Proteome Res.*, **3**, 455-462.
66. Chen X., Cushman S.W., Panel L.K., Hess S. (2005) *J. Proteome Res.*, **4**, 570-577.
67. Foster L.J., de Hoog C.L., Mann M. (2003) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **100**(10), 5813-5818.
68. Ong S.-E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D.B., Steen H., Pandey A., Mann M. (2002) *Mol. Cell. Proteomics*, **1**, 376-386.
69. Schlosser A., Amanchy R., Otto H. (2006) *FEBS J.*, **273**, 3204-3215.
70. Olsen J.V., Blagoev B., Gnad F., Macek B., Kumar C., Mortensen P., Mann M. (2006) *Cell*, **127**, 635-648.
71. Krijgsveld J., Ketting R.F., Mahmoudi T., Johansen J., Artal-Sanz M., Verrijzer C.P., Plasterk R.H.A., Heck A.J. (2003) *Nat. Biotechnol.*, **21**, 927-931.
72. Everley P.A., Krijgsveld J., Zetter B.R., Gygi S.P. (2004) *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, 729-735.

73. *Karimi-Busheri F., Daly G., Robins P., Canas B., Pappin D.J., Sgouros J., Miller G.G., Fakhrai H., Davis E.M., Le Beau M.M., Weinfeld M.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 24187-24194.
74. *Hoss M., Robins P., Naven T.J.P., Pappin D.J.C., Sgorous J., Lindahl D.A.* (1999) *EMBO J.*, **18**, 3868-3875.
75. *Mann M., Jensen O.N.* (2003) *Nature Biotechnology*, **21**, 255-261.
76. *Larsen M.R., Larsen P.M., Fay S.J., Roepstoff P.* (2001) *Electrophoresis*, **22**, 566-575.
77. *Loyet K.M., Stults J.T., Arnott D.* (2005) *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 235-245.
78. *Zubarev R.A., Kelleher N.L., McLafferty F.W.* (1998) *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 3265-3266.
79. *Syka J.E., Coon J.J., Schroeder M.J., Shabanowitz J., Hunt D.F.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9528-9533.
80. *Huang S.-Y., Tsai M.-L., Wu C.-J., Hsu J.-L., Ho S.-H., Chen S.-H.* (2006) *Proteomics*, **6**, 1722-1734.
81. *Posewitz M.C., Tempst P.* (1999) *Anal. Chem.*, **71**, 2883-2892.
82. *Ficarro S.B., McClelland M.L., Stukenberg P.T., Burke D.J., Ross M.M., Shabanowitz J., Hunt D.F., White F.M.* (2002) *Nature Biotechnology*, **20**, 301-305.
83. *Huang C.M., Foster K.W., DeSilva D., Zhang J., Zhi Z., Yusuf N., Van Kampen K.R., Elmets C.A., Tang D.C.* (2003) *J. Investig. Dermatol.*, **121**, 51-64.
84. *Blonder J., Terunuma A., Conrads T.P., Chan K.C., Yee C., Lucas D.A., Schaefer C.F., Yu L.R., Issaq H.J., Veenstra T.D., Vogel J.C.* (2004) *J. Investig. Dermatol.*, **123**, 691-699.
85. *Uematsu R., Furukawa J.-I., Nakagawa H., Shinohara Y., Deguchi K., Monde K., Nishimura S.-I.* (2005) *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 1977-1989.
86. *Nakagawa H., Kawamura Y., Kato K., Shimada I., Arata Y., Takahashi N.* (1995) *Anal. Biochem.*, **226**, 130-138.
87. *Takahashi N., Nakagawa H., Fujikawa K., Kawamura Y., Tomiya N.* (1995) *Anal. Biochem.*, **226**, 139-146.
88. *Yamamoto S., Hase S., Fukuda S., Sano O., Ikenaka T.* (1989) *J. Biochem.*, **105**, 547-555.
89. *Strott C.A.* (2002) *Endocr. Rev.*, **23**, 703-732.
90. *Robbins P., Lippman F.* (1956) *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2652-2653.
91. *Medzihradszky K.F., Darula Z., Perlson E., Fainzilber R.J., Chakley R.J., Ball H., Greenbaum D., Bogyo M., Tyson D.R., Bradshaw R.A., Burlingame A.L.* (2004) *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, 429-443.
92. *Kasai K., Ishii S.* (1975) *J. Biochem (Tokyo)*, **77**, 261-264.
93. *Zhang B., Palcic M.M., Schriemer D.C., Alvarez-Manilla G., Pierce M., Hindsgaul O.* (2001) *Anal Biochem.*, **299**, 173-182.
94. *Hirabayashi J., Arata Y., Kasai K.* (2000) *J. Chromatogr. A*, **890**, 261-271.
95. *Hase S., Ibuki T., Ikenaka T.* (1984) *J. Biochem. (Tokyo)*, **95**, 197-203.
96. *Gerber S.A., Rush J., Stemmen O., Kirschner M.W., Gygi S.P.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6940-6945.

Поступила 31.05. 2007.

METHODS OF QUANTITATIVE PROTEOMICS

A.T. Kopylov, V.G. Zgoda

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul., 10,
Moscow, 119121 Russia; fax: +7 (495) 245 08 57; e-mail: pantalassae@gmail.com

In modern science proteomic analysis is inseparable from other fields of systemic biology. Possessing huge resources quantitative proteomics operates colossal information on molecular mechanisms of life. Advances in proteomics help researchers to solve complex problems of cell signaling, posttranslational modification, structure and functional homology of proteins, molecular diagnostics etc. More than 40 various methods have been developed in proteomics for quantitative analysis of proteins. Although each method is unique and has certain advantages and disadvantages all these use various isotope labels (tags). In this review we will consider the most popular and effective methods employing both chemical modifications of proteins and also metabolic and enzymatic methods of isotope labeling.

Key words: quantitative proteomics, mass spectrometry, isotope label, chemical modification.