**Проектирование программного обеспечения для оптимизации биотехнологических процессов**

Успехи современной протеомики, разработка новых математических и компьютерных подходов и потребности фундаментальной медицины поставили на повестку дня весьма сложную и интригующую задачу - моделирование живой клетки, решение которой в настоящее

*Принятые сокращения*: МД - молекулярная динамика; Y2H (yeast two- hybrid assay) - дрожжевой двугибридный анализ; TAP-MS (tandem affinity purification-mass spectrometry) - аффинная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией; MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ioniza- tion-time of flight) - времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; SELDI (surface enhanced laser desorbtion/ioniza- tion) - активированная поверхностью лазерная десорбция/ионизация; FRET (fluorescence resonance energy transfer) - резонансный перенос энергии элект­ронного возбуждения; FLIM (fluorescence lifetime imaging) - изображение по времени жизни флуоресценции; МАПК - митогенактивируемая протеин- киназа; TNF-a (tumor necrosis factor-a) - фактор некроза опухолей-a; NF-кВ (nuclear factor-кВ) - ядерный фактор-кВ; CDK (cyclin-dependent kinase) - цик- линзависимая киназа; CKI (cyclin-dependent kinase inhibitor) - ингибитор цик- линзависимой киназы; АФП - альфа-фетопротеин; ЭФР - эпидермальный фактор роста; PTB (phosphotyrosine-binding) - фосфотирозинсвязывающий; САТ - серинацетилтрансфераза; ОАСС - О-ацетилсеринсульфогидролаза; SH (Src homology) - гомолог продукта онкогена вируса куриной саркомы.

*Адреса для корреспонденции*: aaterent@mtu-net.ru, nmoldogazieva@mail.ru, shaitan@moldyn.org

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского гуманитар­ного научного фонда (грант № 09-06-00241а). время становится возможным с помощью достижений современных теоретических и экспериментальных методов. Некоторыми авторами уже предприняты попытки создания статической модели клетки, на основе знаний не только о строении клетки и внутриклеточных органелл, их биохимического состава, но и о локализации и приблизи­тельном количестве молекул всех, существующих в клетке, низко- и высокомолекулярных соединений [1]. Однако моделирование живой, «работающей», клетки, т.е. создание её динамической модели, учитывающей изменения во времени и в пространстве химического состава клетки, а также особенности протекания всех внутри- и межклеточных биохимических процессов, является значительно более сложной задачей [2]. Еще более сложным представляется создание динамических моделей разных типов клеток, а также клеток, находящихся в различных физиологических и патофизиологических состояниях, в зависимости от микроокружения или внешних сигналов. Особый интерес представляет моделирование клетки, находящейся на разных стадиях жизненного цикла, включая её деление, дифферен­цировку и гибель.

Решение таких сложных задач требует сбора большого количества экспериментальных и теоретических данных и учета двух важных и взаимосвязанных, на наш взгляд, аспектов. С одной стороны, необ­ходим системный подход, интегрированный взгляд на процессы, происходящие в клетке и/или в её отдельных компартментах. Рассмот­рение клетки как единого целого является предметом исследования относительно новой междисциплинарной области науки - системной биологии [3-6]. Она обеспечивает интеграцию знаний, полученных на различных уровнях, от молекулярного до тканевого или организмен­ного, и с помощью разных экспериментальных и теоретических методов. Целью системной биологии является выяснение того, каким образом совместное функционирование различных составляющих клетки или ткани обуславливает нормальное протекание биологичес­ких и физиологических процессов в организме.

Изучение клетки с точки зрения системной биологии предполагает наличие у клеточных составляющих приобретенных, так называемых производных, свойств или функций (emerging properties). Это озна­чает, что те или иные функции становятся возможными только при достижении определенного уровня сложности организации системы. При этом каждая из составляющих в отдельности может не обладать свойствами (и функциями), которые приобретает система из двух составляющих. А система из двух составляющих может не обладать свойствами и функциями более сложно устроенных систем. Такая интеграция предполагает рассмотрение клетки в широком диапазоне временных и пространственных масштабов. А это требует знаний о детальных качественных и количественных параметрах изменений на всех уровнях, включая межмолекулярные взаимодействия, что, в свою очередь, дает представление о целостных процессах, проистекающих на уровне всей клетки.

Современные экспериментальные методы предоставляют возмож­ности осуществлять исследования либо на уровне целой клетки, как, например, методы микроскопии, либо на уровне отдельных молекул. Рассмотрение всех клеточных процессов в совокупности, с одновре­менным изучением детальных молекулярных механизмов того или иного процесса, пока не представляется возможным. С применением математических и компьютерных методов моделирования становится возможным изучения процессов и явлений, исследование которых с помощью даже высокоэффективных экспериментальных методов оказывается затруднительным [7, 8]. Если математические методы основаны на описании и анализе внутри- и межклеточных процессов и явлений с помощью системы математических уравнений, то компью­терные методы, в основном, имеют целью создание алгоритмов для имитации биологических процессов, их конструирования и визуализации. Для динамического моделирования детальных механизмов межмолекулярных взаимодействий и биохимических процессов, происходящих в клетке, все большие возможности предоставляют различные варианты метода молекулярной динамики (МД) [9].

Для моделирования, описания и анализа многих реально сущест­вующих процессов, происходящих как в биологических, так и в небиологических системах, используют различные типы сетей, образованных группами взаимодействующих компонентов. Среди биологических сетей особое место для изучения функционирования клетки занимают молекулярные сети, к которым относятся генные, белковые, метаболические и сигнальные сети. По своим свойствам и принципу организации все эти типы молекулярных сетей отно­сятся к комплексным сетям. Отражая сложность организации биоло­гических систем, они являются объектом исследования системной биологии [10]. Анализ молекулярных сетей позволяет выявлять функциональные модули в них и выяснять роль каждого из компо­нентов сети в функционировании клетки. Группы физически взаимо­действующих белков, которые функционируют в клетке совместно и скоординированно, контролируя взаимосвязанные процессы, происходящие в организме, образуют *белковые сети*. Белки, как ключевые биомакромолекулы, являются основными участниками почти всех клеточных процессов. Поэтому моделирование живой клетки невозможно без всей совокупности данных динамической протеомики, которая изучает изменения концентраций и локализации белков и их взаимодействия друг с другом [11-13].

Нарушение белок-белковых взаимодействий может приводить к возникновению различных заболеваний, включая опухолевые, нейро- дегенеративные, сердечно-сосудистые, аутоиммунные и др. Поэтому изучение взаимодействующих партнеров и анализ белковых сетей, образованных белок-белковыми взаимодействиями, представляет собой важный инструмент в диагностике заболеваний, выяснении механизма их возникновения и развития, а также эффективности тех или иных терапевтических подходов [14, 15].

В настоящее время становится признанным, что большинство белков эукариот являются мультимодульными и полифункциональ- ными [16, 17]. Каждый из модулей может выполнять самостоятельную функцию, в результате чего белок приобретает способность выполнять целый комплекс различных функций. В связи с мультимодульностью и полифункциональностью большинства белков эукариот их сложные белковые сети могут переплетаться друг с другом. Потому важным инструментом в моделировании живой клетки является структурно­функциональное картирование белков, позволяющее локализовать их функционально важные участки, в том числе и те, благодаря которым осуществляются белок-белковые взаимодействия.

Настоящий обзор посвящен описанию, обобщению и анализу данных по белок-белковым взаимодействиям и белковым сетям, полу­ченных с помощью современных экспериментальных и теоретических методов. Описаны принципы, лежащие в основе современных методов изучения белок-белковых взаимодействий. При этом проведен анализ преимуществ и недостатков тех или иных экспериментальных мето­дов и описаны современные подходы, предпринимаемые разными группами авторов для решения возникающих проблем. Показана роль анализа белковых сетей в решении задач фундаментальной медицины. Рассмотрены методы моделирования *in silico* и проведен анализ возможностей МД методов в создании динамической модели клетки.

1. КАРТИРОВАНИЕ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

ИНТЕРАКТОМЫ

Всё множество белков в клетке находится в динамическом взаимо­действии друг с другом, и эти взаимодействия обуславливают функ­ционирование и поведение живой клетки. Обратимые белок-белковые взаимодействия представляет собой один из видов динамических процессов, происходящих в клетке и позволяющих судить о её функционировании. Интенсивные исследования, осуществляемые в этой области в течение последних лет, способствовали постепенному накоплению данных о взаимодействующих парах белков и об обра­зованных ими белковых комплексах. В течение последних двух десятилетий был разработан ряд высокоэффективных и высоко­производительных экспериментальных методов для изучения белок-белковых взаимодействий, которые, однако, не лишены недостатков. Поэтому экспериментальные методы дополняются различными теоретическими подходами, включая математические и компьютерные методы исследований. При этом белок-белковые взаимодействия изучаются отдельно для разных биологических видов, а для высших эукариотических организмов - также отдельно для разных тканей и типов клеток.

Вся совокупность белок-белковых взаимодействий, характерная для данного организма, получила название *интерактома*. Структурная организация интерактомов и общее количество взаимодействий в них являются одними из важных факторов, определяющих сложность биологических систем. Количество копий тех или иных белков, при­ходящихся на одну клетку, может колебаться от нескольких десятков (менее 50) до миллионов [18]. Поэтому интерактомы даже простых организмов могут быть образованы довольно большим количеством взаимодействий. Так, например, размер интерактома у дрожжей *S. cerevisiae* может составлять, по одним данным, до 10-17 тысяч, а по другим - до 25-35 тысяч взаимодействий [19]. Статистическая оценка возможного размера интерактома человека показала, что он может быть образован примерно 650 тысячами взаимодействий. При этом размер интерактома человека оказался приблизительно в 10 раз больше, чем у *D. melanogaster,* и может в 3 раза превышать размер интерактома *C. elegans* [20]. Эти данные позволили сделать предположение о том, что размер интерактома коррелирует с уровнем сложности организации того или иного биологического вида.

Определение физически взаимодействующих пар белков позволяет составлять интерактомные карты, которые представляют собой графы, состоящие из узлов, в которых расположен тот или иной белок, и связей между ними, показывающих парные взаимодействия (рис. 1). Интерактомные карты рассматриваются в качестве ключей к получению знаний о функционировании белков в клетках [21]. На основании данных, полученных методами *in vitro,* составляются статические интерактомные карты, анализ которых, как будет пока­зано далее, позволяет описывать динамические белок-белковые взаимодействия, существующие в условиях *in vivo*. Составление интерактомных карт полезно также и для фундаментальной меди­цины, а именно для определения роли отдельных белков и их взаимо­действий в возникновении и развитии заболеваний, их диагностики, а также возможных мишеней для действия различных лекарств и контролирования эффективности лечения.

Известные в настоящее время интерактомные карты довольно неполны даже для простейших организмов. Кроме того, данные, полученные разными группами авторов, часто противоречивы. Взаимодействующие пары и белковые комплексы, идентифициро­ванные одной группой исследователей, не обнаруживаются другими авторами. Тем не менее, разработка новых экспериментальных и теоретических подходов, которые будут обсуждаться ниже, приводит к постепенному накоплению данных, необходимых для анализа белок-белковых взаимодействий, существующих в клетке.

Экспериментальными методами в настоящее время определяются взаимодействующие пары белков и белковые комплексы, в основном, у прокариот или простых эукариотических организмов. Для выявления белок-белковых взаимодействий у более сложных организмов, таких как млекопитающие, дополнительно используется метод предсказания их на основании гомологии с белками, взаимодействующие партнеры для которых были выявлены у более простых организмов [22]. Данный подход основан на существовании гомологии между родственными белками и сравнении степени консервативности первичной и прост­ранственной структуры одного и того же белка у разных биологи­ческих видов. Например, если экспериментально показано, что два каких-либо белка у дрожжей взаимодействуют друг с другом, то предполагается, что у человека эти белки также взаимодействуют. Две пары белков у разных организмов, эволюционно сохранивших способность взаимодействовать друг с другом, получили название интерологов. Предсказание взаимодействующих пар белков дает более или менее надежные результаты лишь при условии высокой степени сходства их первичных последовательностей. Кроме того, как показывают исследования последних лет, данные, полученные с помощью самых высокоэффективных экспериментальных методов,



Рис. 1. Карта белок-белковых взаимодействий *Drosophila melanogaster.*

В отдельном окне в увеличенном виде показана подсеть, включающая Ras и другие малые ГТФ-азы. Рисунок представлен с разрешения Camonis, J. и Daviet, L. [96].

могут быть неточными (надежность даже таких методов, как дрожжевой двугибридный анализ, не превышает 50% [23]). Поэтому в настоящее время целый ряд работ посвящен уточнению и корректировке уже имеющихся данных с использованием сочетания различных экспери­ментальных и теоретических методов для построения более точных карт физического взаимодействия белков [24-26].

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Первоначально для изучения белок-белковых взаимодействий использовались биохимические методы, такие как химическое сшивание, совместное фракционирование в процессе хроматографии, коиммунопреципитация. Однако в последующем для определения интерактомов того или иного организма были разработаны такие высокоэффективные и высокопроизводительные экспериментальные методы, как дрожжевой двугибридный анализ (Y2H - yeast two-hyb­rid assays), фаговый дисплей, аффинная очистка в тандеме с масс- спектрометрией (TAP-MS - tandem affinity purification-mass spec­trometry) [27-30]. Широкие возможности для целей динамической протеомики предоставляют также различные методы микроскопии, а также математические и компьютерные методы. В ряде обзоров эти методы подробно описаны [27, 31, 32]. Поэтому здесь мы остановимся лишь на основных принципах этих методов.

*Дрожжевая двугибридная система.* Дрожжевой двугибридный анализ позволяет с высокой точностью определять белок-белковые взаимодействия в условиях *in vivo*. Метод основан на использовании факторов транскрипции, которые характеризуются модульностью строения и состоят из физически и функционально разделимых доменов: ДНК-связывающего (BD - binding domain) и домена актива­ции транскрипции (AD - activation domain). Физическое разделение BD и AD доменов приводит к инактивации фактора транскрипции. Активация соответствующих генов становится возможной при реконструкции фактора транскрипции путем слияния этих двух доменов с двумя другими белками - X (называемым «наживкой») или Y (называемым «добычей»), которые взаимодействуют друг с другом [27]. Для создания двугибридной системы обычно используют ДНК- связывающие домены фактора транскрипции GAL4 у *S. cerevisiae* или репрессора lexA у *E. coli*. В качестве активирующих доменов наиболее часто используют домен активации транскрипции белка GAL4 и белок B42, у *S. cerevisiae* и *E. coli*, соответственно [33].

Дрожжевые клетки трансфицируют двумя плазмидами, первая из которых содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок X, сцепленный с BD доменом, а вторая кодирует белок Y, сцепленный с AD доменом. В результате ДНК-связывающий домен совместно с белком X соединяется с определенной последователь­ностью репортерного гена, а с другим участком ДНК этого гена связывается AD домен совместно с белком Y. Так как участки ДНК репортерного гена, с которым связываются регуляторные белки, находятся достаточно близко друг к другу, без физического взаимодействия между белками X и Y активации репортерного гена не произойдет. По наличию продуктов экспрессии репортерного гена в клетках дрожжей можно судить о существовании взаимодействия между анализируемыми белками.

Метод дрожжевого двугибридного анализа был впервые приме­нен С. Филдсом и О. Сонгом в 1989 г. при изучении фактора транс­крипции GAL4 у дрожжей *S. cerevisiae,* регулирующего экспрес­сию гена, кодирующего синтез фермента в-галактозидазы [34], который расщепляет лактозу до глюкозы и галактозы. В составе GAL4 выделяют два функционально важных домена: N-конце­вой ДНК-связывающий домен, способный взаимодействовать с операторной последовательностью UASg, и С-концевой домен акти­вации транскрипции, богатый кислыми аминокислотами. Об уровне экспрессии в-галактозидазы судят по степени окраски клеточных колоний, продуцирующих фермент, после их инкубации с субстра­том. Высокий уровень активации транскрипции наблюдается только в случае, если оба гибридных белка присутствуют в клетке дрож­жей. Если белки X и Y взаимодействуют друг с другом, то из двух гибридных белков реконструируется функционально активный белок GAL4, и имеет место активация транскрипции.

При использовании системы LexA точность определения обеспе­чивается использованием дрожжевых штаммов, содержащих репор­терные гены, несущие различное число LexA операторных элементов в промоторах репортерных генов (обычно, lacZ и LEU2). Более чувст­вительные штаммы дрожжей обладают до шести LexA-связыващими элементами, в то время как менее чувствительные штаммы содержат только 2 связывающих элемента [27].

Дрожжевая двугибридная система была предложена в качестве метода для скрининга библиотек белков, способных взаимодейство­вать с неким известным белком, используемым в качестве «наживки». Возможность определения физического взаимодействия между разными белками позволяет использовать данную систему для опре­деления специфических аминокислотных остатков, ответственных за взаимодействие [35]. Однако Y2H метод не позволяет оценивать взаимодействия с участием трех и более белков, за исключением таковых у дрожжей. Кроме того, данный метод не всегда позволяет судить о функциональной значимости наблюдаемых физических белок-белковых взаимодействий.

*Метод аффинной очистки в тандеме с масс-спектрометрией* был предложен в 1999 г. Ригаутом c соавт. как оригинальный способ очистки белков, экспрессируемых в естественных условиях в физиологичес­ких концентрациях [29]. Метод основан на использовании аффинной метки, которая присоединяется к белку-мишени. Конструкция, состоящая из генов, кодирующих компоненты метки и белок-ми­шень, внедряется с использованием ретровируса в клетку-хозяин, способную поддерживать экспрессию белка-мишени на уровне, близком к физиологическому. Стандартная метка, используемая у дрожжей, состоит из двух иммуноглобулин G-связывающих фраг­ментов белка А у *Staphylococcus aureus,* участков для воздействия протеазы вируса табачной мозаики и кальмодулинсвязывающего пептида. Комплекс белка-мишени с меткой выделяют из экстракта клеток путем последовательной двухэтапной процедуры аффинной очистки. Первый этап очистки основан на связывании IgG-сефа­розой части метки, представленной белком А, после чего комплекс подвергается воздействия вышеуказанной протеазы. Второй этап основан на связывании части метки, представленной кальмодулин- связывающим пептидом с кальмодулин-сефарозой в присутствии кальция, и комплекс элюируется с помощью ЭДТА. Использование аффинной метки позволяет осуществлять достаточно быструю очистку белковых комплексов из небольшого числа клеток без необходимости предварительного выяснения белкового состава комплексов и функций отдельных белков в них. В комбинации с масс-спектрометрией данный метод обеспечивает осуществление идентификации исследуемых белков и их взаимодействий [36].

Вначале метод аффинной очистки в тандеме с масс-спектромет­рией был применен для изучения белок-белковых взаимодействий и функциональной организации протеомов у простых организмов. Так, в результате работы, проведенной большой группой немецких ученых, в клетках дрожжей *S. cerevisiae* были экспрессированы сотни белков с аффинной меткой, а также изучена их способность форми­ровать комплексы с другими белками [37]. В результате этой работы было очищено 589 белковых комплексов и предсказаны функции для 344 различных белков.

Впоследствии метод TAP-MS был адаптирован для изучения белок-белковых взаимодействий у других организмов, в том числе мле­копитающих [38]. Было предложено много разновидностей аффинных меток, а также разработаны метки, легко удаляемые c использованием специфических пептидаз [39, 40]. Для увеличения эффективности метода при изучении белок-белковых взаимодействий в клетках млекопитающих были разработаны также метки с использованием G-белка, обладающего большей аффинностью к иммуноглобулину G, чем белок А. Вместо кальмодулинсвязывающего пептида можно использовать стрептавидинсвязывающий пептид (GS-TAP - G-protein streptavidin-binding peptide TAP), а для элюции - биотин. Это приводит к десятикратному увеличению количества обнаруживаемых белковых комплексов и повышению специфичности метода. Данный подход позволяет осуществлять с использованием небольшого количества клеток очистку белковых комплексов, которые ранее не удавалось очистить стандартным методом TAP-MS [38].

*Масс-спектрометрия* основана на определении масс молекул, таких как пептиды или белки, путем предварительной их ионизации и распределения полученных ионов в электрическом поле в зависи­мости от соотношения массы к заряду (m/z) [30]. Различают два типа мягкой ионизации, наиболее часто используемые в масс-спектро­метрии: матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI - matrix-assisted laser desorption/ionization) и метод электро­напыления (ESI - electrospray ionization). Наибольшую популярность в протеомных исследованиях получил метод MALDI, при котором образец, содержащий пептиды, смешивается с молекулами специ­фической матрицы, на которую воздействует ионизирующий пучок лазера [41, 42].

Впервые возможность применения матрицы для подавления фраг­ментации при анализе нелетучих органических соединений, таких как белки и пептиды, была продемонстрирована в 1987 году немецким ученым М. Карасом с соавт. [43]. Матрица представляет собой мате­риал, свойства которого обуславливают ионизацию анализируемых молекул, а также понижение деструктивной способности лазерного излучения. Выбивающиеся при этом ионы проходят через масс- анализатор и попадают на детектор, снимающий масс-спектры ионов в соответствии с их значением соотношения массы к заряду m/z. Полученные спектры анализируются путем их сопоставления со спектрами, содержащимися в соответствующих библиотеках, для чего используются специальные компьютерные программы. Одной из разновидностей MALDI является времяпролетная масс- спектрометрия MALDI-TOF (TOF - time of flight), при которой время пролета ионов через масс-анализатор зависит от массы и заряда изу­чаемых веществ [44, 45].

Другой универсальной разновидностью масс-спектрометрии, активно применяемой в протеомных исследованиях, является акти­вированная поверхностью лазерная десорбция/ионизация (SELDI - surface enhanced laser desorbtion/ionization). В этом методе образец, содержащий пептиды, не смешивается с матрицей, а наносится на поверхность специального чипа, который в дальнейшем помещается в вакуумную ячейку, где происходит ионизация исследуемых пептидов или небольших белков [46, 47]. Полученные ионы разгоняются в направлении детектора, в зависимости от их массы. Недостатком дан­ного способа является невозможность непосредственной идентифи­кации белков, представленных в масс-спектрах. Для идентификации белков используют дополнительные методы, такие как, например, фракционирование с помощью ионообменной хроматографии и электрофореза в полиакриламидном геле [48].

Использование масс-спектрометрии, в том числе и в сочетании с другими методами анализа, является в настоящее время универсаль­ным подходом для идентификации белковых маркеров различных заболеваний, включая опухолевые, сердечно-сосудистые и др. [45, 46]. Масс-спектрометрия, наряду с другими методами протеомного анализа, такими как двумерный электрофорез, жидкостная хромато­графия, белковые биочипы, широко используется также для оценки эффективности тех или иных терапевтических подходов [49].

*Метод фагового дисплея* применяется для изучения взаимодейст­вия молекул, в том числе белок-белковых взаимодействий, и выявле­ния участков, ответственных за эти взаимодействия. Он основан на использовании бактериофагов для соотнесения генов и кодируемых ими белков. При этом в оболочке фага оказывается представленной (displayed) белковая молекула, информация о которой содержится в рекомбинантной ДНК вируса [50, 51]. Для этих целей используются нитевидные фаги M13, fd и f1, которые наилучшим образом подходят для конструирования рекомбинантной ДНК. Наличие в фаговом геноме участка, который несущественен для его жизнедеятельности, является важнейшим условием для создания гибридных молекул ДНК. В фаговый геном встраивают чужеродный ген, кодирующий синтез определенного белка или пептида (селективного маркера), который после синтеза оказывается представленным в оболочке фага. Фаг, несущий рекомбинантную ДНК, внедряется в бактериальную моле­кулу (*E.coli*), где происходит его размножение (амплификация). Таким образом, создаются библиотеки, содержащие миллионы фагов, каждый из которых содержит в своем капсиде уникальный белок (или пептид). Далее осуществляют процесс, называемый *in vitro* селекцией, в котором производят скрининг этих библиотек путем взаимодействия экспонированных на поверхности фагов белков с определенным иммобилизованным лигандом.

Метод фагового дисплея обеспечивает прослеживание прямой зависимости между фенотипом и генотипом, так как в оболочке фага оказывается экспрессированной молекула белка, информация о структуре которой содержится в ДНК вируса. Благодаря простоте и высокой скорости анализа последовательности ДНК, метод фагового дисплея позволяет осуществлять быструю идентификацию исследуе­мых белков. Используя подобную технологию рекомбинантных ДНК, можно также создавать библиотеки белков или пептидов.

Одним из подходов для оценки белок-белковых взаимодействий является использование фаговых клонов, способных специфически взаимодействовать с полистироловой поверхностью и несущих гены, кодирующие аффинные метки, существенно увеличивающие сродство к этой поверхности [52]. В качестве модельных систем используются мультиферментные комплексы или комплекс антиген- антитело. Например, цистеинсинтазный мультиферментный комплекс у *E.coli* содержит два фермента, а именно серинацетилтрансферазу (САТ) и О-ацетилсеринсульфгидролазу (ОАСС), которые при условии достаточной концентрации серы взаимодействуют друг с другом. При этом активность САТ возрастает, а активность ОАСС падает, что приводит к образованию О-ацетилсерина. Иммобилизация на полистироловой поверхности гибридного фермента ОАСС, получен­ного либо путем генетического слияния или химического сшивания с пептидной меткой, увеличивает интенсивность сигнала, оцени­ваемого с помощью иммуноферментного анализа, по сравнению с сигналом, полученным при иммобилизации только фермента. Более того, когда меченный пептидами фермент предварительно взаимо­действует с САТ в растворе с последующей иммобилизацией на полистироловой поверхности, интенсивность сигнала еще больше увеличивается благодаря взаимодействию этих ферментов без каких- либо стерических препятствий.

*Методы микроскопии* в настоящее время широко используются как для количественной оценки изменений концентраций и внутри­клеточной локализации различных белков, так и для качественного изучения белок-белковых взаимодействий. Белковые комплексы, образованные благодаря белок-белковым взаимодействиям, могут быть исследованы путем выявления в клетках областей белковых скоплений [53]. Современные методы микроскопии, такие как флюо­ресцентная микроскопия и криоэлектронная томография, позволяют визуализировать внутриклеточные структуры с разрешением до 4-5 нм [54, 55]. Диаметр белковой глобулы составляет, в среднем, 3-5 нм, а макромолекулярных комплексов - 10-100 нм. Поэтому сочетание двух вышеуказанных методов позволяет реконструировать макромо­лекулы, их комплексы и отдельные внутриклеточные структуры в их нативном состоянии [56, 57].

Сочетание методов микроскопии с различными эксперименталь­ными подходами, а также с вычислительными методами даёт возмож­ность не только в целом представить внутриклеточную архитектуру, но и создать полный и всеобъемлющий пространственный молекулярный атлас интактной клетки [58]. Так, создаваемый таким способом молекулярный атлас человека содержит информацию о наборах генов и профили экспрессии белков в различных нормальных и патологических тканях. В данном атласе белки классифицированы в соответствии с выполняемыми функциями, а также по тканям и биологическим жидкостям, в которых они обнаруживаются [59].

Для изучения белок-белковых взаимодействий применяют такие методы флюоресцентной микроскопии, как Ферстеровский индук­тивный резонансный перенос энергии электронного возбуждения (FRET - fluorescence resonance energy transfer) и изображение по времени жизни флуоресценции (FLIM - fluorescence lifetime imaging). Они позволяют осуществлять качественный анализ белок-белковых взаимодействий с изучением как динамики конформационных изме­нений, происходящих в белках, в пространстве и во времени, так и аминокислотных последовательностей, участвующие во взаимо­действии [60]. Флюоресцентная микроскопия основана на измерении различных характеристик флюоресценции, таких как интенсивность, время затухания, поляризация и длина волны. Метод FRET основан на измерении количества энергии, испускаемой возбужденной молекулой флюорофора и переносимой на молекулу акцептора. Перенос энергии проявляется по увеличению флюоресценции акцептора, которое сопровождается тушением флюоресценции молекулы - донора энергии [61, 62]. При этом перекрывание спектра флюоресценции донора со спектром поглощения акцептора является необходимым условием для переноса энергии. В то же время это условие создает помехи при измерении спектров, и это является недостатком метода. Устранение этого недостатка обес­печивает использование метода FRET для количественной оценки расстояния между взаимодействующими парами молекул в условиях *in vitro* и *in vivo,* что нашло применение в лазерно-сканирующей конфокальной микроскопии. FLIM микроскопия основана на изме­рении времени жизни флюоресценции в каждой точке пространст­венного изображения [63]. Она позволяет не только оценивать взаи­модействия между белками, но и анализировать локальное окружение флюорофоров, например, pH среды или концентрации различных ионов, кислорода и т.д.

В настоящее время активно разрабатываются методы микроско­пии с использованием флюоресцентных белков в качестве молекуляр­ных маркеров, позволяющих наблюдать в реальном времени динами­ческие изменения локализации и концентраций тысяч белков в различных частях одной, отдельно взятой, клетки. Для этих целей создается библиотека клеточных клонов, каждый из которых флюо­ресцентно мечен по какому-либо определенному белку. Данный подход по получению меченых белков с сохранением их естественной локализации и функций в условиях живой клетки был разработан Ярвиком и соавт. во второй половине 90-х годов и успешно апро­бирован у *С. reinhardtii* и *D. melanogaster* [64, 65]. Впоследствии метод был применен для создания библиотек клеток, меченных с помощью флюоресцентных белков у млекопитающих, в том числе и у человека [66]. Изучение клетки с точки зрения системной биологии предполагает интеграцию всех ее составляющих на разных уровнях организа¬ции - от атомного до клеточного и тканевого. Такая интеграция подразумевает взаимосвязь, взаимозависимость и взаимодействие этих составляющих, что лежит в основе их совместного, скоордини¬рованного функционирования. Одними из объектов исследования системной биологии служат молекулярные сети, отражающие слож¬ность организации биологических систем. Разные типы молекулярных сетей, включая генные, белковые, метаболические и сигнальные, используются для моделирования реальных процессов, происходящих в клетке.

В связи с тем, что белки, как ключевые биомакромолекулы, являются участниками почти всех внутри- и межклеточных процес-сов, моделирование живой клетки требует анализа всей совокупности данных динамической протеомики. Физические белок-белковые взаимодействия, существующие в клетке, образуют белковые сети. Для белковых сетей характерна «безмасштабность», модульность и иерархичность организации, наличие свойства «маленького мира». Последнее обстоятельство определяет быструю динамику процессов, описываемых с помощью белковых сетей.

Современные высокопроизводительные экспериментальные методы, используемые для изучения белок-белковых взаимодействий, не лишены недостатков. Результаты, получаемые разными группами авторов весьма противоречивы. В связи с этим одной из актуальных задач на современном этапе развития этой области представляется разработка подходов для получения более надежных и достовер¬ных данных по белок-белковым взаимодействиям. Эти данные способствуют решению в долгосрочной перспективе двух фундамен¬тальных задач системной биологии: а) выявлению динамических структурно-функциональных взаимоотношений на разных уровнях организации живого; б) созданию на этой основе динамической модели клетки (виртуальной клетки) и изучению влияния различных факторов на её функционирование. Все это, в свою очередь, способст¬вует развитию новых подходов к изучению механизмов возникно¬вения, диагностики и лечения заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Betts, M.J., Russell, R.B. (2007) FEBS Lett., 581, 2870-2876.

2. Priami, C., Quaglia, P. (2004) Brief. Bioinform., 5, 259-269.

3. Ideker, T., Galitski, T., Hood, L. (2001) Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 2, 343-372.

4. Liu, E.T. (2005) Cell, 121, 505-506.

5. Friboulet, A., Thomas, D. (2005) Bio-sens. Bioelectron., 20, 2404-2407.

6. Coveney, P. V., Fowler, P.W. (2005) J. R. Soc. Interface, 2, 267-280.

7. You, L. (2004) Cell Biochem. Biophys. 40, 167-184.

8. Fisher, J., Henzinger, T.A. (2007) Nat. Biotechnol., 25, 1239-1249.

9. Шайтан К.В., Турлей Е.В., Голик Д.Н., Терешкина К.В., Левцова О.В., Федик И.В., Шайтан А.К., Ли А., Кирпичников М.П. (2006) Росс. хим. журн., 50, 53-65.

10. Ferrel, J.E., Jr. (2009) J. Biol., 8:2.

11. Shaitan, K.V. (2003) In: Stochastic Dynamics of Reacting Biomolecules (ed. Ebeling,W. et al.) World Scienti¬fic. 283-308.

12. Milo, R. (2007) Mol. Biosyst., 3, 542-546.

13. Trinkle-Mulcany, L., Lamond, A.I. (2007) Science, 318, 1402-1407.

14. Mayer, B.J. (1999) Mol. Biotechnol., 13, 201-213.

15. Houtman, J.C.D., Barda-Saad, M., Samelson, L.E. (2005) FEBS J., 272, 5426-5435.

16. Терентьев А.А., Молдогазиева Н.Т. (2006) Биохимия, 71, 157-172.

17. Zaretsky, J.Z., Wreschner, D.H. (2008) Translat. Oncogenomics, 3, 99-136.

18. Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., Weissman, J. S. (2003) Nature, 425, 737-741.

19. Parrish, J.R., Gulyas, K.D., Finley, R.L., Jr. (2006) Curr. Opin. Biotech- nol., 17, 387-93.

20. Stumpf, M.P.H., Thorne, T., de Silva, E., Stewart, R., An, H.J., Lapper, M., Wiuf, C. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 105, 6959-6964.

21. Cusick, M.E., Klitgord, M.E., Vidal, M., Hill, D.E. (2005) Hum.Mol. Genet., 14, Spec No. 2, R171-81.

22. Mika, S., Rost, B. (2006) PLoS Com- put. Biol., 2, e79.

23. Sprinzak, E., Sattath, S., Margalit, H. (2003) J. Mol. Biol., 327, 919-923.

24. Collins, S.R., Kemmeren, P., Zhao, X.C., Greenblatt, J.F., Spencer, F., Holstege, F.C., Weissman, J.S., Kro- gan, N.J. (2007) Mol. Cell Proteo-mics, 6, 439-450.

25. Singhal, M., Resat, H. (2007) BMC Bioinformatics, 8, 199.

26. Lee, H., Deng, H.., Sun, F., Chen, T. (2006) BMC Bioinformatics, 7, 269.

27. Causier, B. (2004) Mass Spectrom. Rev., 23, 350-367.

28. Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado- Nilsson, E., Wilm, M., Seraphin, B. (2001) Methods, 24, 218-229.

29. Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., Seraphin, B. (1999) Nat. Biotechnol., 17, 1030-1032.

30. Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Wil¬lems, A.R., Sassi, H., Nielsen, P.A., Rasmussen, K.J., Andersen, J.R., Johansen, L.E., Hansen, L.H., Jesper- sen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sorensen, B.D., Matthiesen, J., Hendrickson, R.C., Gleeson, F., Pawson, T., Mo-ran, M.F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C.W., Figeys, D., Tyers, M. (2002) Nature, 415, 180-183.

31. Zhou, M., Veestra, T.D. (2007) Pro-teomics, 7, 2688-2697.

32. Domon, B., Aebersold, R. (2006) Science, 312, 212-217.

33. Bartel, P., Fields, P. (1995) In Me-thods: A Companion of methods in Enzymology, 254, 241-263.

34. Fields, S., Song, O. (1989) Nature, 340, 245-246.

35. Ito, T., Ota, K., Kubota H., Yamaguchi, Y., Chiba, T., Sakuraba K., Yoshida, M. (2002) Mol. Cell Proteomics, 1(8), 561-566.

36. Kaiser, P., Meierhofer, D., Wang, X., Huang, L. (2008) Methods Mol. Biol., 439, 309-326.

37. Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A.,Shultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.A., Copley, R.R., Edelman, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Boymeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., Superti- Furga, G. (2002) Nature, 415(6858), 141-147.

38. Burckstummer, T., Bennet, T., Prera-dovic, A., Schultze, G., Hantschel, O., Superti-Furga, G., Bauch, A. (2006) Nat. Methods, 3(12), 1013-1019.

39. Tagwerker, C., Flick, K., Cui, M., Guerrero, C., Dou, Y., Auer, B., Baldi, P., Huang, L., Kaiser, P. (2006) Mol. Cell. Proteomics, 5(4), 737-748.

40. Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G.E., Pedersen, J. (2006) Protein Expr. Purif., 48, 1-13.

32. Fields, S., Song, O. (1989) Nature, 340, 245-246.

33. Bartel, P., Fields, P. (1995) In Me-thods: A Companion of methods in Enzymology, 254, 241-263.

34. Ito, T., Ota, K., Kubota H., Yamaguchi, Y., Chiba, T., Sakuraba K., Yoshida, M. (2002) Mol. Cell Proteomics, 1, 561-566.

35. Kaiser, P., Meierhofer, D., Wang, X., Huang, L. (2008) Methods Mol. Biol., 439, 309-326.

36. Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A.,Shultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.A., Copley, R.R., Edelman, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Boymeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., Superti-Furga, G. (2002) Nature, 415, 141-147.

37. Burckstummer, T., Bennet, T., Prera-dovic, A., Schultze, G., Hantschel, O., Superti-Furga, G., Bauch, A. (2006) Nat. Methods, 3, 1013-1019.

38. Tagwerker, C., Flick, K., Cui, M., Guerrero, C., Dou, Y., Auer, B., Baldi, P., Huang, L., Kaiser, P. (2006) Mol. Cell. Proteomics, 5, 737-748.

39. Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G.E., Pedersen, J. (2006) Protein Expr. Purif., 48, 1-13.

40. Domon, B., Aebersold, R. (2006) Science, 312, 212-217.

41. Zhou, M., Veestra, T.D. (2008) Bio- techiques, 44, 667-670.

42. Abu-Farsha, M., Elisma, F., Figeys, D. (2008) Adv. Biochem.Eng. Bio- technol., 110, 67-80.

43. Karas, M., Bachmann, D., Bahr, D., Hillenkamp, F. (1987) Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc., 78, 53-68.

44. Yip, T. T., Hutchens, T. W. (1992) FEBS Lett., 308, 149-53.

45. Ahram, M., Petricoin, E.F. (2008) Biomarker Insights, 3, 325-333.

46. Engwegen, J.Y., Helgason, H.H., Cats, A., Harris, N., Bonfrer, J.M., Schel- lens, J.H., Beijnen, J.H. (2006) World J. Gastroenterol., 12, 1536-1544.

47. Poon, T.C. (2007) Expert Rev. Pro-teomics., 4, 51-65.

48. Sanchez, J.C., Guillaume, E., Lescuyer, P., Allard, L., Carrette, O., Scherl, A., Burgess, J., Corthals, G.L., Burkhard, P.R., Hochstrasser, D.F.J. (2004) Proteomics, 4, 2229-2233.

49. Hong, M.L., Jiang, N., Gopinath, S., Chew, F.T. (2006) Clin. Exp.Phar- macol. Physiol., 33, 563-568.

50. Feng, B., Dai, Y., Wang, L., Tao, N., Huang, S., Zeng, H. (2009) Bio- logicals, 37, 48-54.

51. Conrad, U., Scheller, J. (2005) Comb. Chem. High Throughput Screen, 8, 117-126.

52. Kumada, Y., Zhao, C., Ishimura, R., Imanaka, H., Imamura, K., Nakani-shi, K. (2007) J. Biotechnol., 128, 354-361.

53. Nickell, S., Beck, F., Korinek, A., Mihalache, O., Baumeister, W., Plitz- ko, J.M. (2006) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 7, 225-230.

54. Pepperkok, R., Ellenberg, J. (2006) Nat. Rev. Cell Biol., 7, 690-696.

55. Lucic, V., Forster, F., Baumeister, W. (2005) Annu. Rev. Biochem., 74, 833-865.

56. Baumeister, W. (2005) FEBS Lett., 579, 933-937.

57. Ortiz, J.O., Forster, F., Kurner, J., Lina- roudis, A.A., Baumeister, W.J. (2006) J. Struct. Biol., 156, 334-341.

58. Hober, S., Uhlen, M. (2008) Curr. Opin. Biotechnol., 19, 30-35.

59. Ponten, F., Jirstrom, K., Uhlen, M. (2008) J. Pathol., 216, 387-393.

60. Wallrabe, H., Periasamy, A. (2005) Curr. Opin. Biotechnol., 16, 19-27.

61. Gordon, G.W., Berry, G., Liang, X.H., Levine, B., Herman, B. (1998) Biophys. J., 74, 2702-2713.

62. Periasamy, A., Wallrabe, H., Chen, Y., Barrosso, M. (2008) Methods Cell Biol., 89, 569-598.

63. Suhling, K., French, P.M., Philips, D. (2005) Photochem. Photobiol. Sci., 4, 13-22.

64. Jarvik, J. W., Adler, S. A., Telmer, C. A., Subramaniam, V., Lopez, A. J. (1996) BioTechniques, 20, 896¬904.

65. Jarvik, J. W., Telmer, C. A. (1998) Annu. Rev. Genet., 32, 601-618.

66. Sigal, A., Danon, T., Cohen, A., Milo, R., Geva-Zatorsky, N., Lustig, G., Liron, Y., Alon, U., Perzov, N. (2007) Nat. Protoc., 2, 1515-1527.

67. Sigal, A., Milo, R., Cohen, A., Geva- Zatorsky, N., Klein, Y., Alaluf, I., Swerdlin, N., Perzov, N., Danon, T., Liron, Y., Raveh, T., Carpenter, A.E., Lavah, G., Alon, U. (2006) Nat. Methods, 3, 525-531.

68. Cohen, A.A., Geva-Zatorsky, N., Eden, E., Frenkel-Morgenstern, M., Issaeva, I., Sigal, A., Milo, R., Cohen- Saidon, C., Liron, Y., Kam, Z., Cohen, L., Danon, T., Perzov, N., Alon, U. (2008) Science, 322, 1511-1516.

69. Shoemaker, B.A., Panchenko, A.R. (2007) PLoS Comput. Biol., 3, e43.

70. Ramirez, F., Schlicker, A., Assenov, Y., Lengauer, T., Albrecht, M. (2007) Proteomics, 7, 2541-2552.

71. Kiemer, L., Costa, S., Ueffing, M., Cesarini, G. (2007) Proteomics, 7, 932-943.

72. Li, D., Liu, W., Liu, Z., Wang, J., Liu, Q., Zhu, Y., He, F. (2008) Mol. Cell Proteomics, 7, 1043-1052.

73. Braun, P., Tasan, M., Dreze, M., Barrios-Rodiles, M., Lemmens, I., Yu, H., Sahalie, J.M., Murray, R.R., Roncari, L., de Smet, A.S., Venkatesan, K., Rual, J.F., Vandenhaute, J., Cusick, M.E., Pawson, T., Hill, D.E., Tavernier, J., Wrana, J.L., Roth, F.P., Vidal, M. (2009) Nat. Methods, 6, 91-97.

74. Skrabanek, L., Saini, H.K., Bader, G.D., Enright, A.J. (2008) Mol. Bio- technol., 38, 1-17.

75. Bader, S., Kuhner, S., Gavin, A.C. (2008) FEBS Lett., 582, 1220-1224.

76. Altaf-Ul-Amin, M., Shinbo, Y., Miha¬ra, K., Kurokawa, K., Kanaya, S. (2006) BMC Bioinformatics, 7, 207.

77. Brohee, S., van Helden, J. (2006) BMC Bioinformatics 7, 488.

78. Eilbeck, K., Brass, A., Paton, N., Hodgman, C. (1999) In: «Intelligent Systems for Molecular Biology», AAAI Press, Palo Alto, 7, 87-94.

79. Xenarios, I. E. E. F., Salwinski, L., Duan, X. J., Hegney, P., Kim, S.M., Eisenberg, D. (2002) Nucleic Acids Res., 30, 303-305.

80. Bader, G. D., Betel, D., Vogue, C. W. V. (2003) Nucleic Acids Res., 31, 248-250.

81. Breitkreutz, B.J., Stark, C., Reguly, T., Boucher, L., Breitkreutz, A., Livstone, M., Oughtred, R., Lackner, D.H., Bachler, J., Wood, V., Dolinski, K., Tyers, M. (2008) Nucleic Acids Res., 36 (Database issue), D637-640.

82. Teyra, J., Doms, A., Schroeder, M., Pisabarro, M.T. (2006) BMC Bioin-formatics