

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ им. В. П. АСТАФЬЕВА
(КГПУ им. В. П. Астафьева)

ФАКУЛЬТЕТ БИОЛОГИИ, ГЕОГРАФИИ И ХИМИИ
Выпускающая кафедра биологии и экологии

Якуненко Андрей Владимирович

Выпускная квалификационная работа

РАЗРАБОТКА ЦИКЛА НАУЧНО-ПОПУЛЯРНЫХ ЛЕКЦИЙ ДЛЯ
ОБУЧАЮЩИХСЯ СТАРШЕЙ ШКОЛЫ «ПРОТЕОМИКА – НОВЫЕ
ГОРИЗОНТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ»

по направлению подготовки 44.03.05 Педагогическое образование
(с двумя профилями подготовки)

Направленность (профиль) образовательной программы Биология и химия

ДОПУСКАЮ К ЗАЩИТЕ:

д.б.н., профессор, зав. кафедрой Антипова Е. М.

(дата, подпись)

Руководитель: к.б.н., доцент, Елсукова Е. И.

(дата, подпись)

Дата защиты:

Обучающийся: Якуненко А. В.

(дата, подпись)

Оценка _____

(прописью)

Красноярск 2018

Оглавление

Введение	3
Глава I. СТРУКТУРА И СОДЕРЖАНИЕ ЛЕКТОРИЯ «ПРОТЕОМИКА – НОВЫЕ ГОРИЗОНТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ»	5
1.1. Предмет и основные направления протеомики	5
1.2. Пояснительная записка к циклу научно-популярных лекций «Протеомика – новые горизонты молекулярной биологии»	7
Глава II. «ПРОТЕОМИКА – НОВЫЕ ГОРИЗОНТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ»	11
2.1. Почему белки главные молекулы живого организма и какова их связь с эволюцией?	11
2.2. Тандем электрофореза и Вестерн-блоттинга – с чего все начиналось ..	22
2.3. Поиск иголки в стоге сена. Высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия – протеомный анализ нового уровня	30
2.4. Протеомный паспорт адипозного органа и медицина будущего	39
2.4.1. История открытия и современное состояние проблемы адипозного органа	39
2.4.2. Протеомные исследования в лаборатории биохимии и физиологии энергообмена КГПУ им. В.П. Астафьева	53
Глава III. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ АПРОБАЦИИ НАУЧНО- ПОПУЛЯРНЫХ ЛЕКЦИЙ	59
3.1. Рекомендации к разработке и проведению научно-популярных лекций	62
ВЫВОДЫ.....	64
Библиографический список	66

Введение

Среди мер, направленных на преодоление кризисных явлений в Российской науке, особое внимание уделяется научно-просветительской деятельности в среде школьников. Ее важнейшая задача – популяризация научного подхода, распространение информации о современных научных достижениях в доступной для слушателей форме, что способствует формированию представлений о науке как одной из наиболее привлекательных форм человеческой деятельности, и притоку в нее молодежи [4].

Молекулярная биология – одно из наиболее стремительно развивающихся направлений науки о живом. Внедрение ее методов в различные сферы привели к серии революционных открытий и созданию новых технологий. Расшифровка геномов придала значительный импульс развитию эволюционной биологии, сделала возможной составление генетического паспорта человека. Выяснение закономерностей развертывания геномной информации в онтогенезе, сложных межбелковых взаимодействий в ходе клеточной детерминации и дифференцировки, адаптивных перестроек метаболизма и функций зрелых клеток – задача протеомики – нового направления постгеномной биологии. Протеомные подходы к изучению гетерогенности термогенных жировых тканей, идентификации термогенных адипоцитов нового бежевого типа, такие как электрофорез, вестерн-блоттинг развиваются в лаборатории биохимии и физиологии энергообмена ФБГХ.

Целью данной работы была разработка цикла научно-популярных лекций для обучающихся старшей школы «Протеомика – новые горизонты молекулярной биологии»

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1) На основе анализа литературы о целях, задачах, направлениях протеомики, о протеомных методах анализа в биологии определить тематику научно-популярного лектория для старшеклассников;

2) Разработать тексты и подобрать иллюстративный материал к лекциям, посвященным проблемам структурно-функционального единства и многообразия белков организма, основным методам и подходам в протеомном анализе

3) По результатам собственных исследований при лаборатории биохимии и физиологии энергообмена разработать завершающую лекцию цикла «Протеомный паспорт адипозного органа и медицина будущего»

4) По результатам апробации нескольких лекций разработать рекомендации к чтению научно-популярных лекций у старшеклассников.

Глава I. СТРУКТУРА И СОДЕРЖАНИЕ ЛЕКТОРИЯ «ПРОТЕОМИКА – НОВЫЕ ГОРИЗОНТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ»

1.1. Предмет и основные направления протеомики

Белковые молекулы изучаются около 200 лет в рамках биоорганической химии, биохимии, биофизики. Появление и интенсивное развитие в первом десятилетии 21 века нового направления молекулярной биологии – протеомики означает, что исследования белков вышли на качественно новый уровень. Сведения, полученные в ходе расшифровки генома человека, геномов некоторых животных, а также развитие высокоэффективных быстродействующих методов, таких как масс-спектрометрический анализ в тандеме с высокоэффективной жидкостной хроматографией, 2D электрофорезом, программного обеспечения сделали возможным быстрое секвенирование и идентификацию белков в многокомпонентных белковых смесях, составление протеомных карт клеток, органов, организмов и анализ, таким образом, не отдельных белков, а полных протеомов.

Термин «протеомика» был введен Марком Уилкинсом и др. в 1995 году [83]. Протеомы организмов даже одного вида различаются по разным причинам, важнейшей из которых является генетический полиморфизм. Многообразие белков обусловлено также альтернативным сплайсингом, в результате которого один ген кодирует несколько разных белков, и посттрансляционными модификациями аминокислот в белках. Благодаря химическим посттрансляционным модификациям многообразие белков в конкретном организме на несколько порядков превышает количество кодирующих их генов. По этой причине идентификация белков и пептидов является значительно более сложной задачей, чем идентификация генов. Она усложняется и тем, что в отличие от геномики, в которой существуют разнообразные методики мультиплицирования молекул ДНК, в протеомике

пока такая возможность отсутствует. Среди направлений развития протеомики можно выделить как расширение круга объектов протеомных исследований, так и дальнейшее развитие методов, направленное на увеличение информативности, чувствительности, разрешающей способности, воспроизводимости при повышении скорости анализа. Достижение указанных целей обеспечивается совершенствованием методов предварительной подготовки проб, развитием методов хромато-масс-спектрометрии, подходов к обработке экспериментальных результатов [8]. Первые успехи этого направления способствовали принятию и началу работ по международному проекту «Протеом человека», который, по сути, явился продолжением проекта «Геном человека», начатым в 1990 году.

В протеомике условно выделяют три основных направления: структурное, функциональное и организменное. Последнее часто называют медицинским, подчеркивая его высокую значимость для медицины. Основные задачи структурного направления включают 1) выделение и изучение последовательности аминокислот в белке; 2) выяснение закономерностей сворачивания полипептидной молекулы в нативную конформацию; 3) предсказание белковой конформации на основе первичной структуры. Функциональная протеомика выявляет взаимосвязь структуры и функции и, основываясь на обнаруженных закономерностях строения молекулы белка, предсказывает ее функции. Другая важная задача - изучение взаимодействий различных белков с другими белками, содержащимися внутри клетки и во внеклеточном пространстве. Выяснением роли межбелковых взаимодействий в ходе нормальной клеточной детерминации и дифференцировки и ее нарушений при заболеваниях и старении, в реакциях клеток организма на разные средовые воздействия – задача третьего организменного направления. Для медицины представляет интерес поиск белковых маркеров тех или иных заболеваний, белковых маркеров патологических микроорганизмов, позволяющих осуществлять диагностику

на ранних стадиях путем сравнения протеомов больных и условно здоровых людей. Другая масштабная задача - составление молекулярной модели заболевания с учетом работы и взаимодействий ключевых биомолекул и др. и на этой основе развитие новых эффективных и систематических подходов к созданию и оценке новых лекарств и фармацевтических продуктов, а также создание новых методов диагностики и терапии [89].

Учитывая вышесказанное, можно смело сделать вывод о том, что исследования протеома – стремительно развивающееся новое направление молекулярной биологии, позволяющее решать биологических и медицинских вопросов. Такая актуальность науки и дала стимул к разработке небольшого цикла научно-популярных лекций «Протеомика – новые горизонты молекулярной биологии».

1.2. Пояснительная записка к циклу научно-популярных лекций «Протеомика – новые горизонты молекулярной биологии»

Цель лектория – знакомство старшеклассников с новым научным направлением постгеномной биологии – протеомикой.

Задачи курса:

- развитие научного мировоззрения,
- расширение знаний о современных направлениях молекулярной биологии о высокотехнологичных методах и достижениях протеомного анализа и достижений науки протеомики;
- демонстрация тесной интеграции современной биологии с другими естественными и точными науками;
- повышение уровня заинтересованности у обучающихся старших классов современными высокотехнологическими исследованиями в биологии

Всего запланировано 4 лекции. Первая лекция «Почему белки главные молекулы живого организма и какова их связь с эволюцией?» представляет своего рода введение в проблемы многообразия белковых молекул и их центральной роли в поддержании структурной целостности клетки, ее метаболизме, восприятии сигналов. Опираясь на знания структуры белка, полученные в школьном курсе биологии и химии, в лекции, во-первых, рассматривается переход от химического этапа к биологическому этапу эволюции, обусловленный появлением крупных объемных белковых молекул, способных благодаря внутримолекулярным взаимодействиям радикалов аминокислот к совершению разного вида работ. Белки – почти единственные биомолекулы, способные совершать работу – молекулярные наномашинны. Во-вторых, внимание акцентируется на проблеме эволюции многообразия клеточных белков, роли генетического полиморфизма, интрон-экзонной структуры гена и альтернативного сплайсинга, химических посттрансляционных модификаций. Обусловленные этими механизмами широкие возможности увеличения белкового разнообразия рассматриваются как важнейшие условия прогрессивной эволюции живого. В заключении лекции делается вывод о том, что дальнейшее развитие представлений закономерностей эволюции органического мира, индивидуального развития тесно связано с проблемой каталогизации и, своего рода, систематизации белков клеток и организма в целом. Это заключение является также переходом к двум следующим лекциям.

Две следующие лекции посвящены интенсивно развивающейся методологии и техническому оснащению протеомных исследований, требующих усилий инженеров, математиков и физиков, специалистов в области информатики. В лекции «Гандем электрофореза и Вестерн-блоттинга – с чего все начиналось» описывается метод электрофореза и Вестерн-блоттинга, которые зачастую используются в паре. Эти методы использовались самыми первыми в изучении протеома и широко используются по сей день для различных

целей. В лекции «Поиск иголки в стоге сена. Высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия – протеомный анализ нового уровня» речь идет о наиболее эффективном для каталогизации белков методе высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенном с масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС). Благодаря высокой чувствительности, эффективности, скорости анализа ВЭЖХ/МС сделало революцию в исследовании протеома. Таким образом, в этих трех лекциях рассматриваются проблемы структурной и функциональной протеомики. Материал этих двух лекций требует особого внимания из-за перегруженности техническими деталями, предусмотрены демонстрация оборудования для ПААГ-электрофореза, вестерн-блоттинга, подсушенных гелей и иммуноблотов, по возможности постановка ПААГ-электрофореза, например, белков слюны. Третье направление протеомики, связанное с использованием ее методов в физиологии и медицине, рассматривается в завершающей лекции «Протеомный паспорт адипозного органа и медицина будущего» на примере исследований закономерностей функционирования жировых тканей. Выбор темы обусловлен несколькими причинами. Во-первых, значительный прогресс, достигнутый за последние два десятилетия в понимании сложной структуры «адипозного» органа, его ведущей роли в эволюции гомойотермии, в механизмах развития широко распространенных метаболических заболеваний, в механизмах старения, достигнут именно благодаря использованию протеомных методов. Во-вторых, эта тематика развивается на факультете в лаборатории биохимии и физиологии энергообмена, и автор квалификационной работы принял непосредственное участие в нескольких экспериментах с идентификацией популяций термогенных бежевых адипоцитов по их биомаркеру – разобщающему белку UCP1, в совместном с российско-канадской ассоциированной лабораторией Биомет эксперименте с протеомным профилированием паховой жировой

ткани. Наряду с просветительскими задачами последняя лекция выполняет еще и профориентационную нагрузку.

Таким образом, данный курс наглядно показывает единство неживой и живой природы, диалектический переход от законов физики и химии к новому биологическому качеству при увеличении длины и разнообразия боковых радикалов в макромолекуле, структурно-функциональное единство белковой молекулы, заложенные в ее структуре пути биологической эволюции, широкие возможности для изучения и редактирования «эволюционных ошибок» благодаря современным методам молекулярной биологии, перспективы ее развития.

Глава II. «ПРОТЕОМИКА – НОВЫЕ ГОРИЗОНТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ»

2.1. Почему белки главные молекулы живого организма и какова их связь с эволюцией?

Белки – это биополимеры, в состав которых входят аминокислоты. Существует синоним белков – полимеры. Термин «протеины» происходит от греческого слова «proteios», которое означает «первичный». Этим подчеркивается первостепенная значимость протеинов для всех живых организмов. Интересно, что протеины составляют не менее 50% сухой массы организма человека [9].

В состав белковых молекул входят α -аминокислоты, связанные пептидной связью.

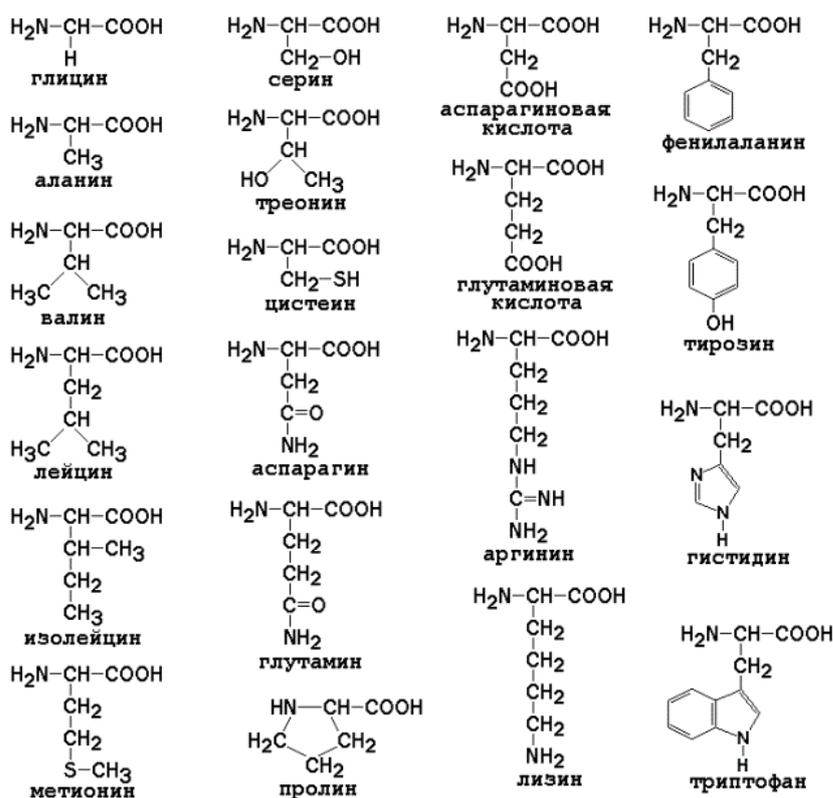


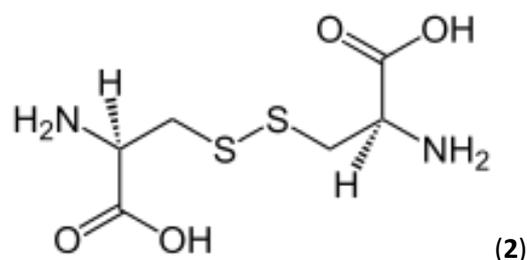
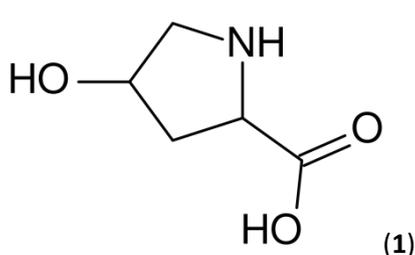
Рисунок 1 - 20 протеиногенных аминокислот

Иными словами, α -аминокислоты как пазл строят общую картину белковой молекулы. Для построения белковых молекул природа использует 20 α -аминокислот (Рис. 1) [9].

Аминокислоты – это органические соединения, в молекулах которых содержится карбоксильная $-\text{COOH}$ и амино $-\text{NH}_2$ группы. α -Аминокислотами же называют те аминокислоты, а молекулах которых аминогруппа соединена с α -углеродным атомом. α -Атомом является первый атом после функциональной группы. В данном случае после карбоксильной группы [9].

Для построения белков необходим источник аминокислот. Многие аминокислоты могут быть синтезированы в живых организмах (растительных или животных). Однако, высшие животные не способны синтезировать в своем организме все аминокислоты и человек в том числе. Организм человека не может синтезировать восемь аминокислот, в связи с этим они являются незаменимыми и должны поступать с пищей [9].

Несмотря на то, что в биосинтезе белка используются всего 20 аминокислот, в молекулах белков встречаются еще 2 аминокислоты – 4-оксипролин (1) и цистин (2). Они являются производными пролина и цистеина.



Стоит отметить, что 4-оксипролин содержится в коллагене – белке, который является основной частью соединительных тканей. Именно из-за отсутствия данной аминокислоты в коллагене развивается болезнь цинга.

Хиральность – свойство молекулы не совмещаться в пространстве со своим зеркальным отражением. Данный термин основан на древнегреческом названии наиболее узнаваемого хирального предмета – руки (Рис. 2) [7].

Все мы хиральны. В зеркале может показаться, что мы вполне симметричны, но посмотрите – при чтении книги вы, скорее всего, листаете страницы правой рукой, а обработка информации идет левым полушарием головного мозга.

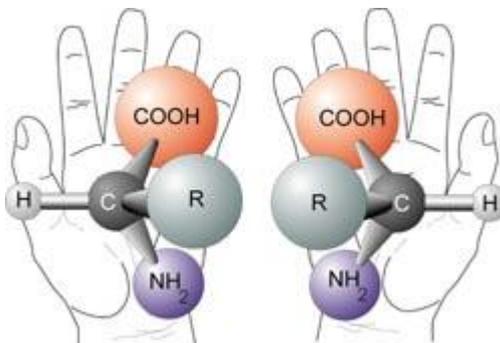


Рисунок 2 - Хиральность молекул

Некоторые организмы хиральны в большей степени: например, ракушки улиток имеют вид закрученной вправо или влево спирали. Природа не просто хиральна – она в основном существует в виде единственного пространственного изомера (энантиомера). Хотя некоторые улитки имеют закрученную влево спираль, подавляющее большинство имеет правозакрученную ракушку [31].

Луи Пастер говорил: «Вселенная диссиметрична» [31]. Он же и открыл оптическую изомерию в 1848 году. Пастер обратил внимание на выпадающие из раствора кристаллы тартрата натрия-аммония (Рис. 3), которые были зеркальным отражением друг друга и не совмещались друг с другом в пространстве.

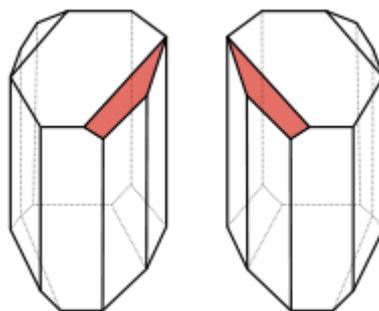


Рисунок 3 - Хиральные кристаллы тартрата натрия-аммония

Проведя ряд экспериментов по кристаллизации, он сделал вывод о существовании хиральности молекул [7].

Хиральные молекулы обладают оптической активностью. Данное свойство обуславливает вращение плоскости плоскополяризованного света. Что это значит? Свет представляет собой хаотичное движение фотонов, как всем известно из курса физики. Также всем известен такой предмет как призма или светофильтр. Пропуская белый свет через призму, мы увидим весь спектр – от красного до фиолетового цвета. Так вот фотоны каждой длины волны спектра становятся уже упорядоченными в отличие от простого белого света. Светофильтры действуют по тому же принципу. Такой свет называется плоскополяризованным, а растворы оптически активных соединений могут вращать плоскость данного света (Рис. 4) [13].

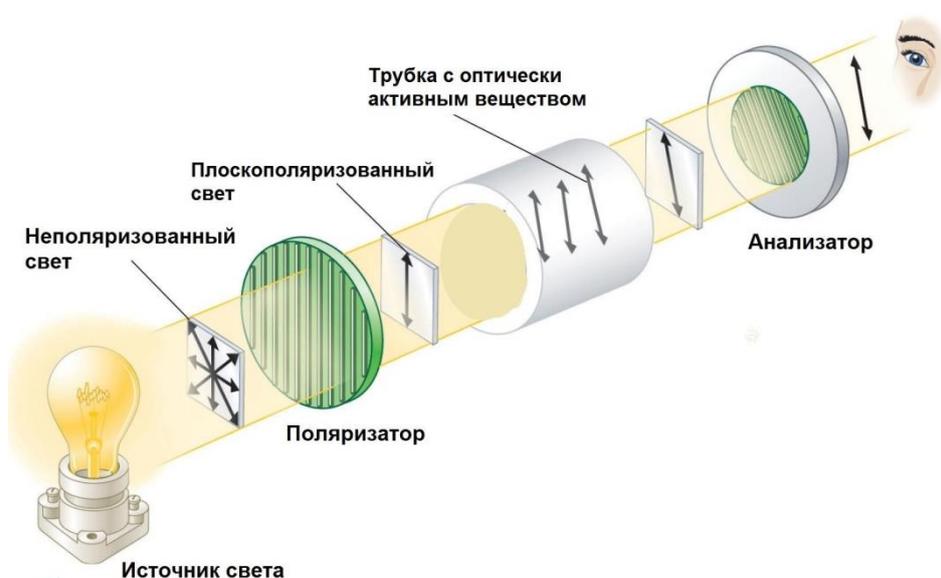


Рисунок 4 - Схема поляризатора

Природа хиральна и ей необходимы молекулы с определенным положением атомов, определенной конфигурацией атомов. Эмиль Фишер в 1891 г. предложил идею относительной конфигурации на основе глицеральдегида, обозначая изомеры по положению гидроксильной группы у α -углеродного атома. Э. Фишер знал, какие группы окружают хиральный

атом углерода в глицеральдегиде, но лишь догадывался относительно их конфигурации и позднее его догадка была подтверждена методом рентгеновской дифракции. С тех пор во всех хиральных молекулах стереоизомеры с конфигурацией, соответствующей конфигурации L-глицеральдегида, обозначают буквой L, а стереоизомеры, соответствующие D-глицеральдегиду, буквой D (Рис. 5) [7].

Эволюционно сложилось так, что аминокислоты в природе присутствуют исключительно в виде L-изомеров.

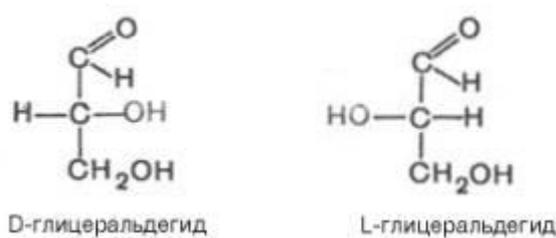


Рисунок 5 - Стереои́зомерия глицеральдегида

Белки, синтезированные искусственным путём из D-аминокислот, не усваиваются организмом; бактерии сбраживают лишь один из изомеров, не затрагивая другой. Интересно, что L-никотин в несколько раз ядовитее D-никотина. Удивительный феномен преимущественной роли только одной из форм оптических изомеров в биологических процессах может иметь фундаментальное значение для выяснения путей зарождения и эволюции жизни на Земле. Присутствие в белковых молекулах лишь L-аминокислот весьма важно, поскольку для образования устойчивых повторяющихся надмолекулярных белковых структур обычно важно, чтобы составляющие их аминокислоты были пространственно одинаковы. Это достигается тем, что клетки умеют специфическим образом синтезировать исключительно L-изомеры аминокислот, поскольку активные центры ферментов являются ассиметрическими, а катализируемые ими реакции стереоспецифичны [7].

Аминокислоты в молекулах белков связаны так называемой пептидной связью. Она очень прочна, даже в лабораторных условиях ее очень сложно разрушить.

Обычно белками называют те полипептиды, которые состоят из более 50 аминокислот. Олигопептиды состоят из менее 10 аминокислот и полипептиды от 10 до 50.

Достаточно небольшие олиго- и полипептиды широко распространены в организме. Это различные гормоны, такие как окситоцин, инсулин, вазопрессин, глюкагон. Некоторые пептиды регулируют пищеварительные процессы, тонус сосудов и артериальное давление, аппетит, оказывают обезболивающий эффект, регулируют сон, обучение, память [7].

Молекулы белков имеют определенную пространственную структуру. Как известно, существует первичная, вторичная, третичная и четвертичная структура белковых молекул. Последняя же структура и определяет то, какую функцию будет выполнять белок. Огромный вклад в стабилизацию структуры белка вносят слабые нековалентные взаимодействия – водородные связи, гидрофобные связи и солевые (ионные) и ковалентные дисульфидные связи. Пространственная организация белка называется конформацией. В природе все стремится к минимуму энергии, белковые молекулы строятся по тому же принципу, поскольку чем меньше внутренняя энергия молекулы, тем устойчивее белок [7].

В постройке белковых молекул участвуют определенный класс белков, который называется «шапероны». В переводе с французского это значит «няня». Данные молекулы следят за тем, чтобы во время синтеза белка не происходило сворачивания его неправильным образом.

Принято считать, что каждый белок как вещество с определенным химическим строением выполняет одну узкоспециализированную функцию и лишь в нескольких отдельных случаях – несколько взаимосвязанных функций. В основном этот принцип верен для глобулярных белков – белков,

в молекулах которых полипептидные цепи плотно свёрнуты в компактные структуры – глобулы [17]. Этот тип белков представляет одну из трех главных групп белков: две другие группы – это фибриллярные белки и мембранные белки, которые обычно обнаруживаются в мембранах клетки и ее органелл [40]. Функции глобулярных белков чрезвычайно многообразны. Они могут быть ферментами (например, амилаза), биологическими мессенджерами (пептидные гормоны – пролактин и инсулин), транспортными белками (глобулин и альбумин), а также структурными белками внутри клеток (тубулин). Глобулярные белки функционируют как антитела (глобулин) в иммунной системе организма, участвуют в процессах репликации и репарации ДНК (полимераза). В глобулярных белках аминокислотная последовательность укладывается таким образом, чтобы увеличить растворимость белка в воде полярные группы атомов размещаются на поверхности белка (где они участвуют во взаимодействии с молекулами воды). Сворачивание и укладка цепей под действием внутримолекулярных сил, которые существуют между разными группами атомов внутри молекулы, а также сил взаимодействия между группами атомов белка и молекул, непосредственно окружающих белок, определяют форму молекулы белка – его третичную структуру. При этом, элементы вторичной структуры (спирали, листы, повороты и петли) играют роль строительных блоков, из которых строится структура высшего порядка, а вся их «функциональная нагрузка» сводится, как правило, к сближению в пространстве аминокислот, образующих места связывания. В глобулярных белках основная роль участков, связывающих элементы вторичной структуры (петель) – обеспечить их «структурную гибкость» относительно друг друга [76].

Однако, как будет показано ниже, существует ряд белков, для которых именно размер и положение петель является определяющим для функционирования белковой молекулы.

С помощью ряда физических методов было обнаружено, что многие белки в изолированном состоянии не обладают уникальной третичной структурой, хотя и имеют при этом четкую функцию при физиологических условиях. Кроме того, по мере появления все большего и большего числа рентгеновских структур белков стало очевидным отсутствие у некоторых из них относительно небольших участков полипептидной цепи. Это дало основание считать такие участки гибкими [36]. Белки, содержащие такие участки, получили название белков с природной или внутренней неупорядоченностью [79]. Доля неструктурированных областей в таких белках может быть разной, начиная от последовательности из нескольких аминокислот и заканчивая полностью неупорядоченной последовательностью длиной в десятки, а иногда и в сотни аминокислот [12]. Главное отличие этих белков от структурированных (глобулярных) белков состоит в том, что они не имеют уникальной третичной структуры в изолированном виде, а приобретают ее после взаимодействия с партнерами. Их конформация в комплексе определяется партнером по взаимодействию, а не только собственной аминокислотной последовательностью, как это характерно для структурированных (глобулярных) белков.

Открытие природно неструктурированных белков позволило расширить представление о том, какую конформацию белка можно считать нативной [35]. В дополнение к принятому нативному состоянию – жесткой уникальной структуре – предлагается рассматривать еще три: 1) расплавленная глобула (компактная структура при несколько бóльшем гидродинамическом объеме, с хорошо развитой вторичной структурой, при отсутствии или следами кооперативно плавящейся третичной структуры), 2) полностью разупорядоченная цепь (набор быстро колеблющихся конформаций) [63], 3) доменная структура, соединенная гибкими и достаточно длинными перетяжками и, как правило, содержащая на концах достаточно длинные неупорядоченные области. Эти четыре состояния

охватывают все конформации, которые известны сегодня из физических представлений о структуре белка.

Кроме того, все эти белки, как правило, полифункциональны – помимо основной функции они имеют дополнительные функции. По этой причине их часто называют белками «по совместительству». Функция белка «по совместительству» может изменяться в зависимости от многих факторов, таких как клеточная локализация, тип клеток, олигомерное состояние, концентрация клеточного лиганда (соединения, образующего комплекс с биомолекулой), субстрата и тому подобное. При этом достаточно часто оказывается, что функционально важные белковые участки находятся именно вне глобулярных доменов.

Элонгационные факторы – специальные белки, которые принимают участие в биосинтезе белка. Они являются одним из примеров природно неструктурированных белков. Элонгационный фактор 1 в бактериальных клетках образует комплекс с ГТФ и тРНК в процессе биосинтеза белка, а в клетках эукариот образует комплексы с различными лигандами, такими как актин, тубулин и регуляторными белками [21].

Всё это противоречит классическому представлению о том, что функционально активный белок обязательно должен быть глобулярным. Кроме того, масштаб конформационных изменений в природно неструктурированных белках при их взаимодействии с партнером гораздо больше, чем в структурированных белках [66].

Количество гибких петель в белках является отпечатком молекулярной эволюции. Длина белка увеличивается с увеличением сложности организма, что является характерной особенностью прогрессивной эволюции. С появлением дополнительных гибких участков появилась и полифункциональность белков. Расширение числа структурных организаций позволило организмам с маленькими размерами выполнять все необходимые им функции. Все это открывает новые возможности для исследования

белковых последовательностей с точки зрения молекулярной эволюции и систематики. [1]

Отдельного внимания заслуживает альтернативный сплайсинг матричной РНК. Биосинтез белка происходит в процессе трансляции генетического кода матричной РНК (мРНК). Перед трансляцией происходит процесс транскрипции – переписывание генетической информации с молекул ДНК на РНК. Молекулы РНК претерпевают некоторые изменения, для того, чтобы они смогли функционировать. Обычно выделяют три вида РНК – транспортная РНК (тРНК), рибосомальная, входящая в состав рибосом (рРНК), и матричная РНК (мРНК), которая является матрицей для синтеза белка и реализации генетической информации. В данном случае мы рассмотрим процесс созревания первичной молекулы мРНК пре-мРНК. После синтеза молекула мРНК представляет комплементарную копию ДНК, но не все участки ДНК несут информацию. Соответственно, молекула мРНК также имеет данные участки и их необходимо вырезать для синтеза правильного белка. Этот процесс называется «сплайсинг» (Рис. 6).

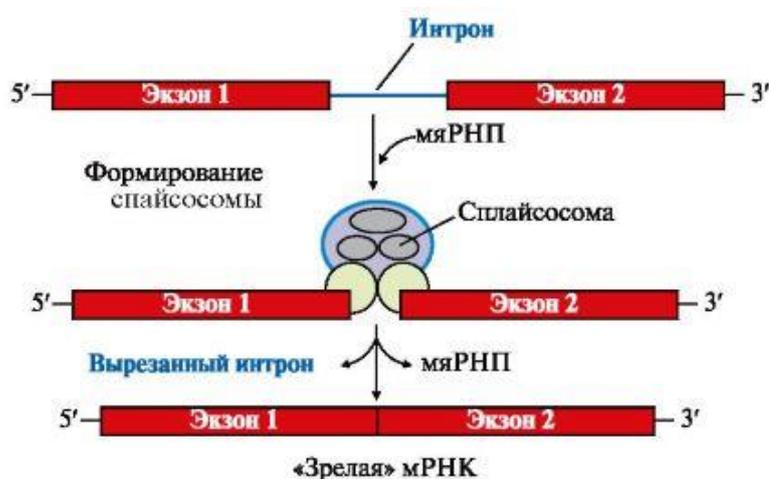


Рисунок 6 - Процесс сплайсинга

Информативные участки мРНК называются экзонами, а неинформативные участки – интронами. Интроны необходимо вырезать из первичного

транскрипта. После этого образуется зрелая мРНК, с которой и синтезируется белок [7].

Для эволюции представляется важным альтернативный сплайсинг (Рис. 7). Что такое альтернативный сплайсинг? Возьмем один первичный транскрипт мРНК, содержащий и экзоны, и интроны. Вырезав интроны, получается мРНК, кодирующий определенный целевой белок. Но в этом же транскрипте некоторые интроны могут служить экзонами для получения другого белка. То есть один первичный транскрипт мРНК может служить для синтеза нескольких белков [7].

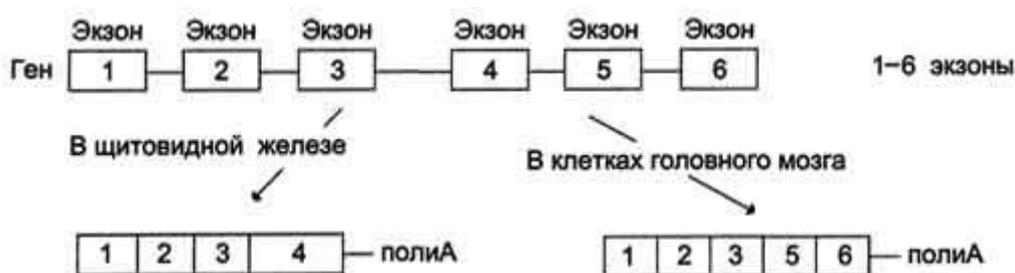


Рисунок 7 - Схема альтернативного сплайсинга

Например, ВИЧ — ретровирус, являющийся причиной развития СПИДа — образует единственную пре-мРНК, из которой далее посредством альтернативного сплайсинга образуется более 40 различных мРНК [87]. Равновесие между сплайсированными по-разному транскриптами обеспечивает образование мРНК, кодирующих все белки, необходимые для репликации вируса [46]. В итоге мы получаем, что данный процесс способствует увеличению разнообразия белков. А это в свою очередь обеспечивает эволюционный процесс на молекулярном уровне. Некоторые данные показывают, что альтернативный сплайсинг был одним из средств, обеспечивающих появление многоклеточных организмов [45]. Альтернативный сплайсинг обеспечивает более экономное хранение генетической информации и является исключением из правила «один ген — один белок».

Из всего вышесказанного можно сделать вывод о том, что без белков жизнь невозможна, поскольку именно они являются конечным этапом реализации генетической информации. Ведь даже деление клетки и передача генетической информации к дочерней клетке невозможна без белков. Белки обладают самыми различными функциями: каталитическая, строительная, защитная, транспортная, сигнальная, структурная, регуляторная, энергетическая. С помощью всех этих функций и происходят все процессы в организме. Также мы выяснили, что протеины играют огромную роль в эволюционном процессе. Все это делает эти молекулы незаменимыми для природы.

2.2. Тандем электрофореза и Вестерн-блоттинга – с чего все начиналось

Перед тем, как говорить о методах анализа белковых молекул, необходимо сказать несколько слов о науке, которая использует данные методы, - протеомика. Протеомика – это наука, предметом изучения которой являются белковые молекулы. Ее задача составить протеом, то есть белковый состав, организма по аналогии с геномикой, которая изучает геном организма.

В 2010 году в Сиднее стартовал международный проект «Протеом человека». Цель данного проекта – создание протеомной карты, включающей все белки, кодируемые геномом человека. Масштаб данного проекта значительно более масштабен, чем «Геном человека», поскольку геном человека состоит примерно из 20 тыс. генов, а количество белков превышает 2 млн. Протеомика заняла уверенное место в молекулярной биологии и развивается высокими темпами. Возможности протеомных методов достаточно велики, об этом и будет идти речь в этой и следующих лекциях.

В первую очередь поговорим об одном из первых и основных методов протеомики – методе электрофореза. Электрофорез белков – способ

разделения смеси белков на фракции или индивидуальные белки. Данный метод основан на движении заряженных белковых молекул в неподвижной фазе в зависимости от их молекулярного веса под действием электрического поля [11].

Прогресс данного метода берет начало в 1955 году, когда Оливер Смитис разработал метод разделения белков с помощью электрофореза в крахмальном геле. Впоследствии стал нобелевским лауреатом. В 1959 году был предложен метод электрофореза в полиакриламидном геле. В 1969 году стали применять денатурирующие агенты в данном методе. И в 1970 году Лэммли усовершенствовал электрофорез в полиакриламидном геле, а его методика имеет применение и по сей день. В 1975 году появился двумерный электрофорез [11].

Принцип метода электрофореза заключается в следующем. Макромолекулы, находящиеся в буферном растворе, обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, знак и величина которого зависят от показателя кислотности рН среды. Если через данный раствор, заключенный в канал из изолирующего материала, например, стеклянную трубку, начать пропускать электрический ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения, т.е. сформируется электрическое поле. Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода, причем их трение об окружающую среду ограничивает скорость миграции. В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают разные скорости и фракция макромолекул разделяется в соответствии с этими параметрами (например, с увеличением массы молекулы снижается скорость движения в среде) [11].

Существует множество вариантов электрофореза белков, но мы остановимся на электрофорезе в полиакриламидном геле (ПААГ-электрофорез) как наиболее распространенном (Рис. 8). Полиакриламид

является полимером на основе акриламида. Варьируя концентрацию полимера, можно получать гели с разными размерами пор.

Изменять заряды макромолекул возможно путем вариации рН буфера, а конфигурацию путем введения денатурирующих агентов (например, додецилсульфат натрия, ДСН). Это все придает методу электрофореза большую гибкость.

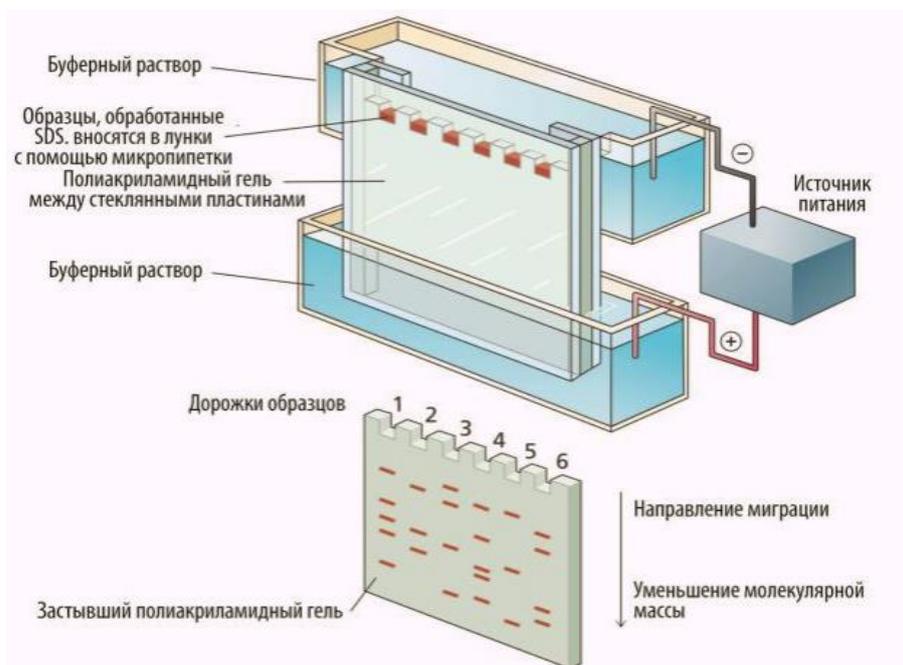


Рисунок 8 - Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле

Говоря о видах электрофореза в полиакриламидном геле, можно выделить 2 вида: нативный и денатурирующий.

Нативный электрофорез выполняется в неденатурирующих условиях, при этом сохраняется естественная структура белкового образца. Это позволяет физическим размерам белка влиять на мобильность в геле, что помогает анализировать все четыре уровня структуры биомолекулы. Для таких образцов детергенты используются только для того, чтобы разрушать липидные мембраны клеток. Однако один недостаток заключается в том, что белковые комплексы могут разделиться не очень чисто или предсказуемо,

так как трудно предсказать, как форма и размер молекулы будут влиять на мобильность ее в геле.

Электрофорез в ПААГ с использованием додецилсульфата натрия (ДСН) позволяет фракционировать белки в зависимости только от одного параметра – их молекулярной массы. Для этого белки в исходном растворе препарата обрабатывают как минимум трехкратным избытком ДСН. За счет гидрофобных взаимодействий детергент связывается с белками. В молекуле ДСН содержится диссоциированный остаток сульфокислоты и несет отрицательный заряд. При связывании молекул ДСН с белками происходит отталкивание сульфогрупп друг от друга и тем самым распрямление цепей белка. Таким образом рвутся нековалентные взаимодействия в белках. Но необходимо порвать и дисульфидные связи, образованные молекулами цистеина, именно так можно добиться полной денатурации. С этой целью белок обрабатывают β -меркаптоэтанолом при нагревании. В ходе электрофореза зоны остаются невидимыми. Для наблюдения за процессом в исходные образцы необходимо добавлять краситель, который будет того же заряда, но не взаимодействует с ними. Краситель передвигается в геле под действием электрического поля в виде окрашенной зоны. Когда окрашенная зона подходит к концу трубки, электрофорез прекращают.

Лучше всего вместо красителя-индикатора использовать уже окрашенные маркеры молекулярной массы. С ними можно не только следить за ходом электрофореза, но и после окрашивания полос знать их массу. Белковые полосы на геле после завершения электрофореза обычно окрашиваются красителем Кумасси (Рис. 9).

Метод определения молекулярной массы белков электрофорезом в ПААГ с ДСН завоевал себе прочную репутацию и широко используется. Однако и здесь надо быть осторожным, ведь бывают белки, для которых соотношение ДСН-белок отличается от обычного. Например, при обработке

рибонуклеазы малеиновой кислотой связывание ДСН с ней снижается в 6 раз [11].

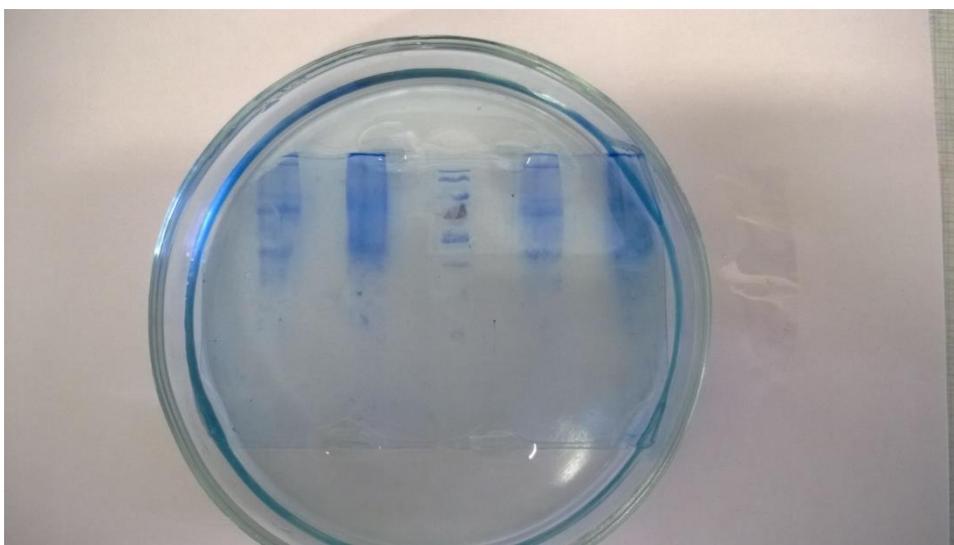


Рисунок 9 - Окрашивание Кумасси треков геля после проведения ПААГ-электрофореза

Эффективность электрофоретических методов зависит от многих факторов, в том числе, от суммарного заряда молекул, ситового эффекта, используемого для электрофореза носителя, присутствия денатурирующих агентов и т. п. Благодаря такой вариабельности электрофорез обладает высокой разрешающей способностью. Однако при исследовании сложной смеси, состоящей из многих белков (а такие исследования приходится проводить довольно часто) некоторые белковые зоны могут перекрываться. В подобных случаях электрофорез во втором направлении может привести к более полному разделению анализируемых веществ, и этот принцип лежит в основе методов *двухмерного* электрофореза. Электрофорез в первом направлении проводят обычным способом, а затем полученную электрофореграмму используют без фиксации и окрашивания в качестве стартовой зоны для электрофореза во втором направлении, перпендикулярном первому (Рис. 10). Если оба этапа электрофореза осуществляются в идентичных условиях, то скорость миграции белков в

обоих направлениях одинакова и зоны разделения молекул располагаются по диагонали.

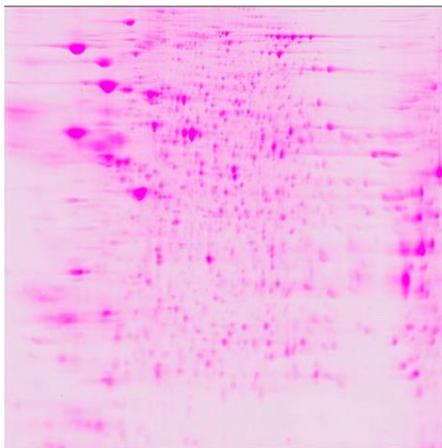


Рисунок 10 - Окрашенная электрофореграмма после двухмерного электрофореза

Очевидно, что такие системы улучшают разделение лишь постольку, поскольку оно зависит от удлинения пути миграции разделяемых белков. Чтобы повысить разрешение в значительной степени, необходимо на втором этапе изменить по крайней мере один из электрофоретических параметров [60].

Огромное значение электрофореза подтверждается сферами применения. Его большая разрешающая способность позволяет анализировать смеси из десятков белков. Широкое применение электрофорез нашел в клинической диагностике. С помощью него можно выявить злокачественные новообразования, иммунодефициты, генетические нарушения, заболевания печени, инфаркт миокарда, рассеянный склероз и так далее. Российские ученые проводили исследование тромбоцитарных белков крови [5]. Тромбоциты играют большую роль в противомикробной защите организма, поскольку они высвобождают низкомолекулярные белки *тромбодефенсины*. Из-за быстрой адаптации микроорганизмов к антибиотикам и их токсичности для организма

необходимо искать новые препараты против инфекционных заболеваний. Для этого они выделяли и исследовали с помощью физико-химических методов, включая электрофорез в ПААГ, тромбоденсин. А достоинство биопрепаратов заключается в том, что они не токсичны для организма [5]. Более того, белковые исследования с помощью электрофореза показали существование четырех генетически дискретных и репродуктивно изолированных видов мышей рода *Apodemus* [6]. Это показывает, что данный метод применим и для систематики.

Электрофорез может использоваться как индивидуальный метод, но часто его можно встретить в паре с еще одним методом протеомного анализа, который называется Вестерн-блоттинг.

При электрофорезе происходит разделение смеси белков в геле. Но это не покажет какого-то конкретного белка, его необходимо распознать на «треках» геля. Для этого и существует Вестерн-блоттинг. Данный метод основан на иммунохимическом распознавании. То есть распознавание по схеме антиген-антитело. Блоттинг является аналитическим методом, направленным на определение специфичных белковых молекул.

Ранее мы говорили о том, что гель после электрофореза окрашивается. Если за электрофорезом следует Вестерн-блоттинг, то стадия окрашивания пропускается. После разделения смеси в геле необходимо перенести белковые молекулы на твердый носитель – мембрану. Обычно используют нитроцеллюлозную мембрану или поливинилиденфторидную. Первая же имеет большее применение ввиду того, что она дешевле.

Первым этапом собирается «сэндвич» (Рис. 11). Кладут лист фильтровальной бумаги, на нее гель, на гель накладывается мембрана, а на мембрану еще один слой фильтровальной бумаги. Этот сэндвич кладут между двумя плоскими электродами для электропереноса. Так же, как и в электрофорезе весь процесс происходит под действием электрического тока. В ходе переноса с геля на мембрану белки сохраняют свое местоположение.

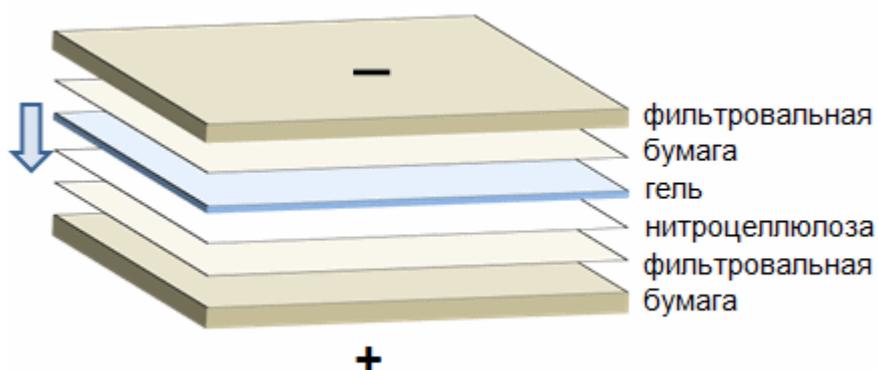


Рисунок 11 - «Сэндвич» для Вестерн-блоттинга

Удерживаются белки на мембране за счет гидрофобных взаимодействий и электростатических взаимодействий. Но дело в том, что мембрана неспецифично связывает все белки, а нам необходим конкретный белок. После переноса на мембрану происходит ее блокирование. Для чего это необходимо? На мембране есть всего несколько участков, где прикреплены белки, и для большей точности все пустое пространство необходимо заблокировать. Делается это следующим образом: берется мембрана с белками и вымачивается в растворе бычьего сывороточного альбумина или нежирного сухого молока. Альбумин или белок молока будет связываться во всех пустых местах, но не будет связываться с белками, которые уже были на мембране. Последний этап – обработка антителами. Мембрана помещается в раствор антител и там выдерживается. Антитела – специфические белковые молекулы, которые связываются лишь с одной молекулой-субстратом. То есть они не будут связываться с другими белками на мембране, а только с тем, который нам необходим. После этого же мембрана окрашивается и исследуется на наличие участков связывания. Лучше всего, если антитела при связывании сами дают цветную реакцию [77].

Идентификация разобщающего белка 1 (UCP1) происходит именно так. После блокирования мембраны раствором бычьего сывороточного альбумина происходит обработка мембраны первичными кроличьими антителами против UCP1. Связывание этих антител с разобщающим белком не дает

никакого окраса. Следующий шаг – обработка другими антителами, которые будут связываться с кроличьими антителами. То есть получается 3 слоя: разобщающий белок 1-первичные антитела-вторичные антитела. Вторичные антитела связаны с ферментом, который называется щелочная фосфатаза. При обработке специальным субстратом данный фермент дает окраску и можно сразу увидеть наличие разобщающего белка (Рис. 12) [3].

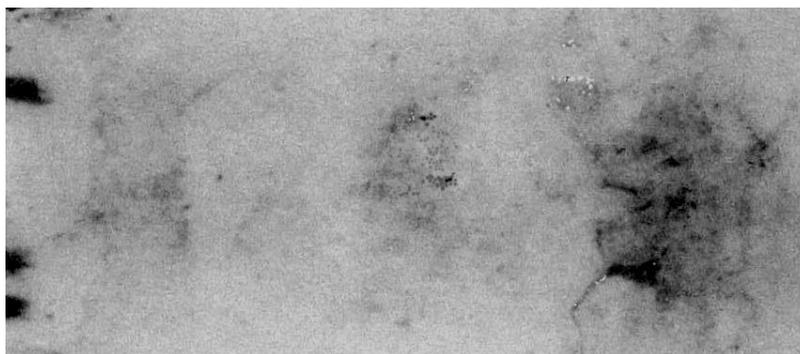


Рисунок 12 - Идентификация разобщающего белка 1 на нитроцеллюлозе после Вестерн-блоттинга

Таким образом, из смеси белков можно выделить один конкретный белок и с помощью различных методик определить его концентрацию в какой-либо из тканей.

2.3. Поиск иголки в стоге сена. Высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия – протеомный анализ нового уровня

Решение многих задач в современной постгеномной биологии требует анализа и сопоставления полных протеомов клеток и даже тканей. Собственно с постановки таких задач и возникло направление протеомики. Метод, который позволил ставить такие задачи и быстро, точно и эффективно с высокой степенью разрешения характеризовать белковые образцы – это высокоэффективная жидкостная хроматография, совмещенная с масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС) (Рис. 13) [49].



Рисунок 13 - Прибор ВЭЖХ/МС

ВЭЖХ/МС один из самых мощных способов анализа пептидов и белков на сегодняшний день. Ее основное преимущество в сравнении с другими методами высокая чувствительность, для анализа требуется всего 10^{-15} моль вещества [73]. Создание баз данных с первичной структурой белков человека и некоторых животных, с массами их протеолитических фрагментов сделало возможным крайне высокую разрешающую способность (глубину) исследования протеомов.

Для начала пару слов о ВЭЖХ. ВЭЖХ – это аналитический метод, позволяющий разделить смеси образцов на индивидуальные компоненты. То есть, если у вас имеется смесь белков, то с помощью данного метода на выходе вы можете получить отдельно каждый белок из этой смеси. Не вдаваясь в технические подробности метода ВЭЖХ, стоит сказать о сердце прибора – хроматографической колонке (Рис. 14). Колонка представляет собой цилиндр. Она может быть из стекла, но большую практичность имеют колонки из титана. Колонка наполняется сорбентом – неподвижной фазой, сверху подается образец с растворителем и происходит разделение.



Рисунок 14 - Колонка для ВЭЖХ

Таким образом, в основе разделения – неодинаковая способность разных белков задерживаться или, говоря языком химии, сорбироваться на неподвижной фазе. Задержка в выходе белков с колонки по сравнению с растворителем обусловлена их взаимодействиями с сорбентом. В данном методе принято говорить о нормально-фазовой ВЭЖХ, если сорбент является полярным, а растворитель – неполярным. В анализе белков используется обращенно-фазовая ВЭЖХ (ОФВЭЖХ), в которой, как можно догадаться, используется неполярный сорбент и полярный водный растворитель [10]. Это имеет смысл, поскольку белки являются полярными молекулами и должны растворяться в растворителе для разделения. Результат ВЭЖХ – это хроматографические спектры – хроматограммы, которые показывают время удержания в колонке той или иной молекулы. По этим данным и производят идентификацию молекулы (Рис. 15).

Рассмотрим, какие события происходят в масс-спектрометре, когда туда подается образец, представленный молекулами неизвестного вещества. Сначала образец переводят в газообразное состояние, затем его ионизируют, т.е. превращают из нейтральной молекулы в заряженную – катион-радикал.

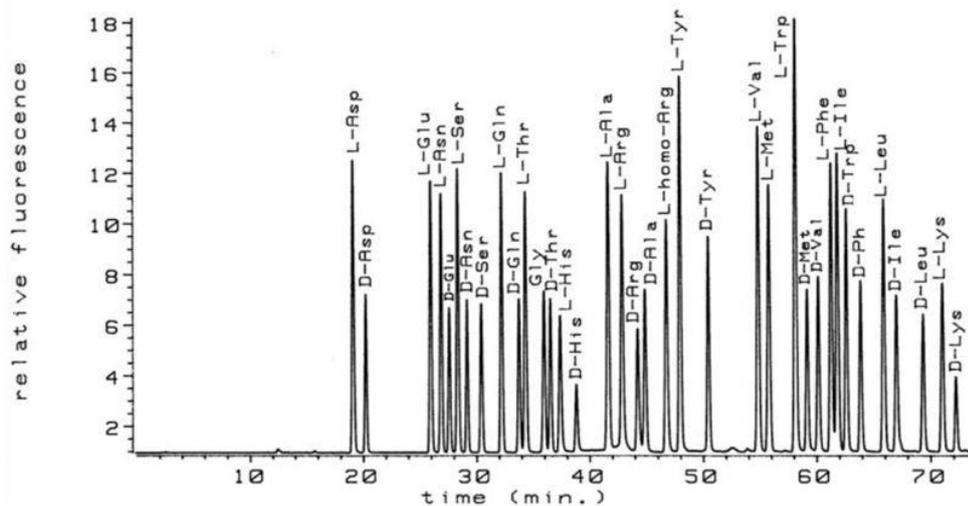


Рисунок 15 - Хроматограмма смеси аминокислот (по оси абсцисс указывается интенсивность пика, по оси ординат – время удерживания)

Обычно это происходит с помощью бомбардировки потоком электронов, которые бьют по молекуле и выбивают из нее электроны (Рис. 16).

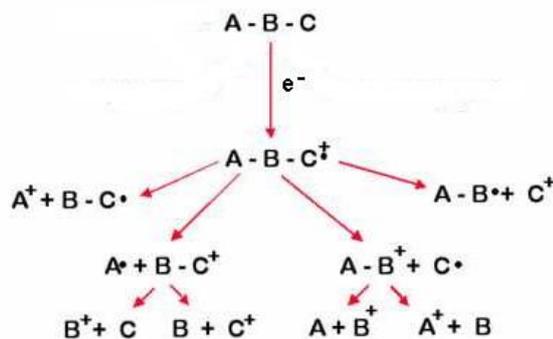


Рисунок 16 - Схема фрагментации молекулы в масс-спектрометре после ионизации

Метод масс-спектрометрии отличается от всех других физико-химических методов тем, что при анализе происходит разрушение образца (в том же ВЭЖХ вы получите целые молекулы) в процессе фрагментации молекулы. Представьте, что вы бросаете кирпичи в кирпичную стену, они не повредят центральную часть стены, но соьют кирпичи с ее верхнего края [31]. Тем самым молекулы приобретают заряд. Далее поток ионов долетает до масс-

детектора, причем скорости движения ионов обратно пропорциональны их массам.

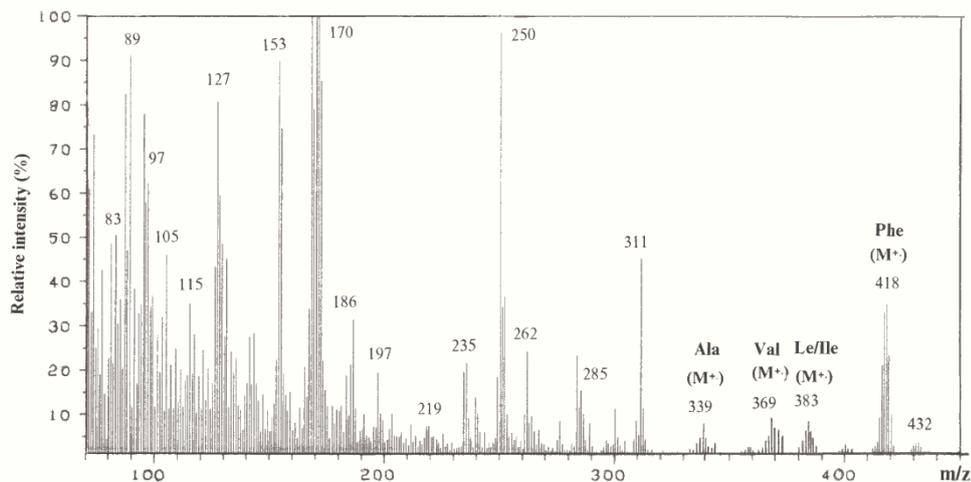


Рисунок 17 - Масс-спектр L-фенилаланинсекретирующего штамма аэробных грамположительных факультативных метилтрофных бактерий

Полученные и проанализированные компьютером масс-спектры представлены пиками, которые указывают молекулярные массы нефрагментированной молекулы и ее отдельных фрагментов (Рис. 17).

Полученный масс-спектр сопоставляют с имеющимися в специальных базах данных или расшифровывают вручную [31].

Но как быть, если требуется проанализировать смесь из разных веществ? Как разобрать все пики, соотнести их с той молекулой, фрагмент которой показывает этот пик? Решение этой проблемы заключается в последовательной подаче в масс-спектрометр отдельных компонентов смеси, предварительно уже разделенной другим методом, например, ОФВЖХ. Начиная с 1970-х г разработка ЖХ/МС была сосредоточена на решении проблем соединения этих двух методов. Главной проблемой были подача потока образца из хроматографа в вакуум масс-спектрометра, а также совместимость подвижной фазы (растворителя) хроматографа и работы МС и ионизация молекул образца [73].

В 1980-х годах были доступны несколько систем подачи образца из ЖХ в МС. Среди них интерфейс подвижного ремня [15], термоспрей [16] и высокоскоростная бомбардировка атомов [24]. Коммерчески доступным был первый. Похож этот интерфейс на ленту конвейера: образец из хроматографа осаждается на движущуюся ленту и растворитель на ней выпаривается, тем самым остаются сухие образцы, которые попадают в масс-анализатор. В 1983 году появилась технология термоспрея [81]. Добавляя нагревание к источнику ионизации, происходит образование самого термоспрея. Спрей содержит анализируемый образец, который с большой скоростью попадает в масс-спектрометр. Выглядит это примерно так, будто вы брызните из пульверизатора, только вместо воды у вас смесь анализируемых молекул. Технология термоспрея и была использована для исследования белковых молекул [81].

Еще одной проблемой была ионизация образца в масс-спектрометре. На сегодняшний день наибольшее распространение получили методы матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI) и ионизация электроспреем (ESI). Эти методы позволяют переводить в газообразное состояние неразрушенные молекулы, одновременно ионизировать их и проводить внутри прибора их фрагментацию. Метод MALDI заключается в облучении лазером образца короткими импульсами (Рис. 18).

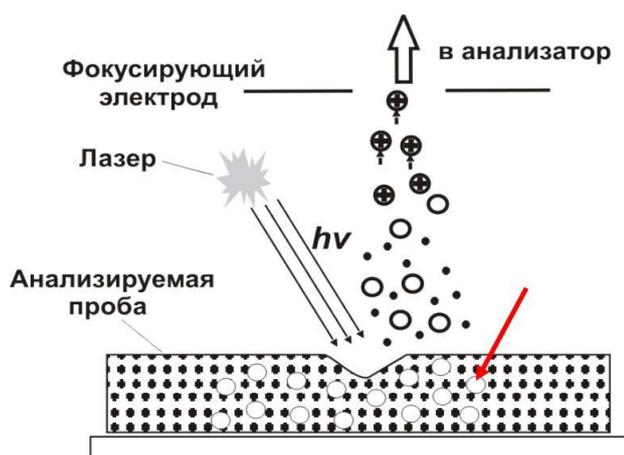


Рисунок 18 - Схема ионизации MALDI

Образец в данном случае представляет собой твердый раствор анализируемого вещества в органической матрице. Над поверхностью образца образуется плазма, в которую попадают молекулы анализируемого образца. Их ионизация происходит путем поглощения энергии фотонов, а затем полученные ионы образца вытягиваются из области ионизации и попадают в масс-анализатор.

Электроспрейная ионизация ESI произвела революцию в исследованиях сложных смесей, поскольку позволяет совмещать ВЭЖХ и МС. Первые испытания этого метода были проведены в 1985 г. Когда вытекающая жидкость проходит через наконечник иглы, электрический заряд переходит на поверхность этой жидкости и образуются силы отталкивания, которые разрывают жидкость на заряженные капельки, содержащие в себе образец. Далее капля распадается из-за сил отталкивания и образуются ионы анализирующего вещества, которые попадают в масс-спектрометр (Рис. 19) [8].

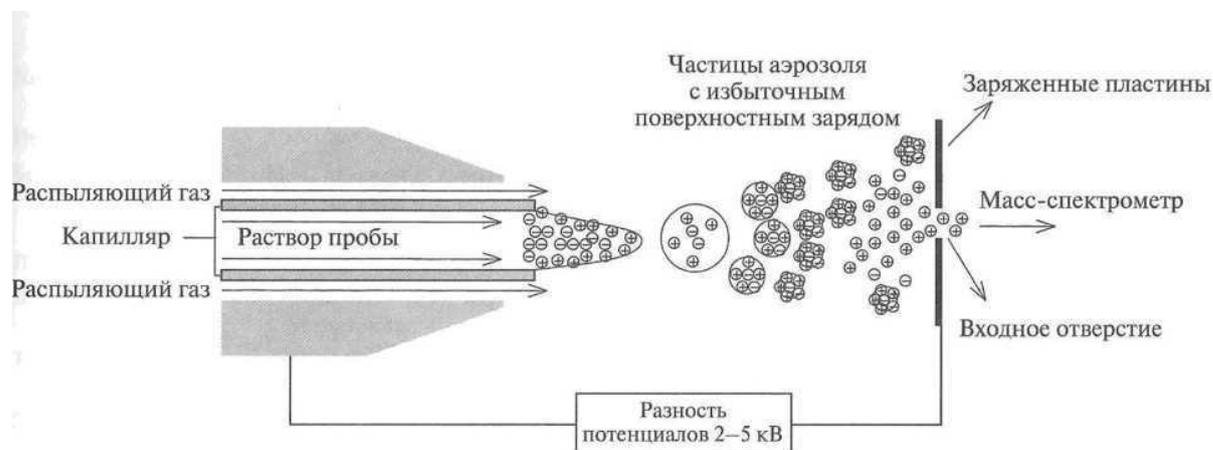


Рисунок 19 - Схема ионизации ESI

Существует три основных метода МС для анализа белков:

- 1) Анализ интактных (неизмененных) белков
- 2) Анализ «нарезанных» белков на пептиды с помощью ферментов

3) Секвенирование (разделение) аминокислот тандемной масс-спектрометрией (МС/МС)

В первом случае измеряется точная масса интактного белка. Только эта информация может предоставить достаточные доказательства для проверки правильности последовательности белка и его чистоты, а также для обнаружения любых химических и посттрансляционных модификаций [27, 74]. Но как быть с белками, в которых, например, одна из аминокислот заменена на аминокислоту с близкой массой. Масса не изменилась, но белок уже другой. Соответственно, такие белки только по массе отличить невозможно. Но такие проблемы могут быть решены приборами с большой точностью ± 0.5 Да (Дальтоны – ед. измерения массы, экв. г/моль) [25].

Вторая категория включает в себя анализ порезанного белка на пептиды протеолитическими ферментами. Чаще всего используются эндопептидазы: химотрипсин и, особенно, трипсин. Далее пептидную смесь разделяют с помощью ОФВЭЖХ и анализируют дальше с помощью МС. Пептидную последовательность получают после анализа полученных масс-спектров [18].

Тандемная масс-спектрометрия МС/МС имеет 2 масс-анализатора и является более эффективной по сравнению с МС. Разделение в МС/МС имеет преимущество в требовании меньшей очистки образца и выигрыш во времени [43]. Очень эффективен МС/МС с ESI в изучении трипсиновых пептидов. Комбинация ферментативного расщепления и ВЭЖХ/МС/МС может обеспечить очень мощный метод для характеристики первичной структуры белка.

Крупномасштабное и автоматизированное исследование белков с помощью ОФВЭЖХ и ESI-МС/МС стало стандартной практикой для характеристики большого количества белков. Определение по набору пептидов полной последовательности белка осуществляется с помощью специального программного обеспечения, которое ищет по базам данных

массы пептидов и исходя из того, каким ферментом были расщеплены белки, составляет полную картину и дает название изначального белка, что очень упрощает задачу интерпретации спектров вручную [85]. Полезность метода ВЭЖХ/МС/МС в исследованиях протеома была продемонстрирована в крупномасштабной автоматизированной характеристике дрожжевых белков [34]. Пептидные фрагменты загружали в систему ВЭЖХ, которая была соединена с масс-спектрометром. 40 образцов анализировалось автоматически в течение суток. Быстрая скорость детекции образцов позволяла получать спектры каждую секунду. Полученные спектры сразу же обрабатывались с помощью программы. На характеристику 40 смесей методами электрофореза и Вестерн-блоттинга ушло бы намного больше времени, что доказывает высокую эффективность метода ВЭЖХ/МС/МС.

Карты пептидов, пополнившие базы данных, существенно облегчили поиск белков по пептидам. Обычно исследователю требуется только задать параметры для поиска в базе данных, такие как таксономическая категория, диапазон массы белка, возможные модификации аминокислот. Ключом к успеху, в первую очередь, является массовая точность пептидов. Другие факторы, которые будут влиять на идентификацию белка, включают искусственные или посттрансляционные модификации белка. Но эти факторы можно учесть при настройке программы для поиска [75]. Вместо того, чтобы использовать только информацию о молекулярных массах пептидов, другой стратегией идентификации белка является использование данных фрагментации пептидов, полученных МС/МС [86]. Информация, полученная из тандемных масс-спектров, включает в себя молекулярные массы пептидов, состав аминокислот и последовательность пептидов. Был разработан метод, который позволяет осуществить поиск в базе данных последовательность белка с использованием неинтерпретированных спектров фрагментации МС/МС. Это является большим плюсом в автоматизированных ВЭЖХ/МС.

В настоящее время использование ВЭЖХ/МС/МС для анализа сложных пептидных смесей стало одним из основных подходов к протеомике на основе МС. Значительный прогресс протеомного анализа демонстрирует необходимость объединения в наше время усилий биологов и физиков, химиков, информатиков для решения фундаментальных проблем.

2.4. Протеомный паспорт адипозного органа и медицина будущего

2.4.1. История открытия и современное состояние проблемы адипозного органа

В процессе эволюции млекопитающие приобрели очень важный орган, который помогает им справляться с низкими температурами среды и переживать период голодания, и это адипозный орган. Адипозный с латинского «*adiposus*» переводится как жирный. То есть, этот орган включает в себя всю массу жировых тканей организма. Ученые до недавних пор не придавали значения ему, но в последние годы он стал одним из изучаемых органов в организме, поскольку, как оказалось, он выполняет не только энергетическую функцию [29].

Адипозный орган можно поделить на два скопления: подкожное и висцеральное, т.е. внутреннее. Говоря о мелких млекопитающих, таких как грызуны, то подкожное скопление можно разделить на переднее и заднее. Первое в свою очередь располагается между лопатками, около шеи и в подмышечных впадинах. Второе же занимает область от поясницы до ягодиц и паховой области.

Висцеральное скопление плотно расположено вместе с внутренними органами. Его можно разделить на следующие скопления: в грудной клетке (средостенное), около почек (перирентальное), окологонадное, брыжеечное и ретроперитонеальное (забрюшинное пространство). Масса всего адипозного органа у грызунов составляет около 20% тела и является одним из крупных органов (Рис. 20).

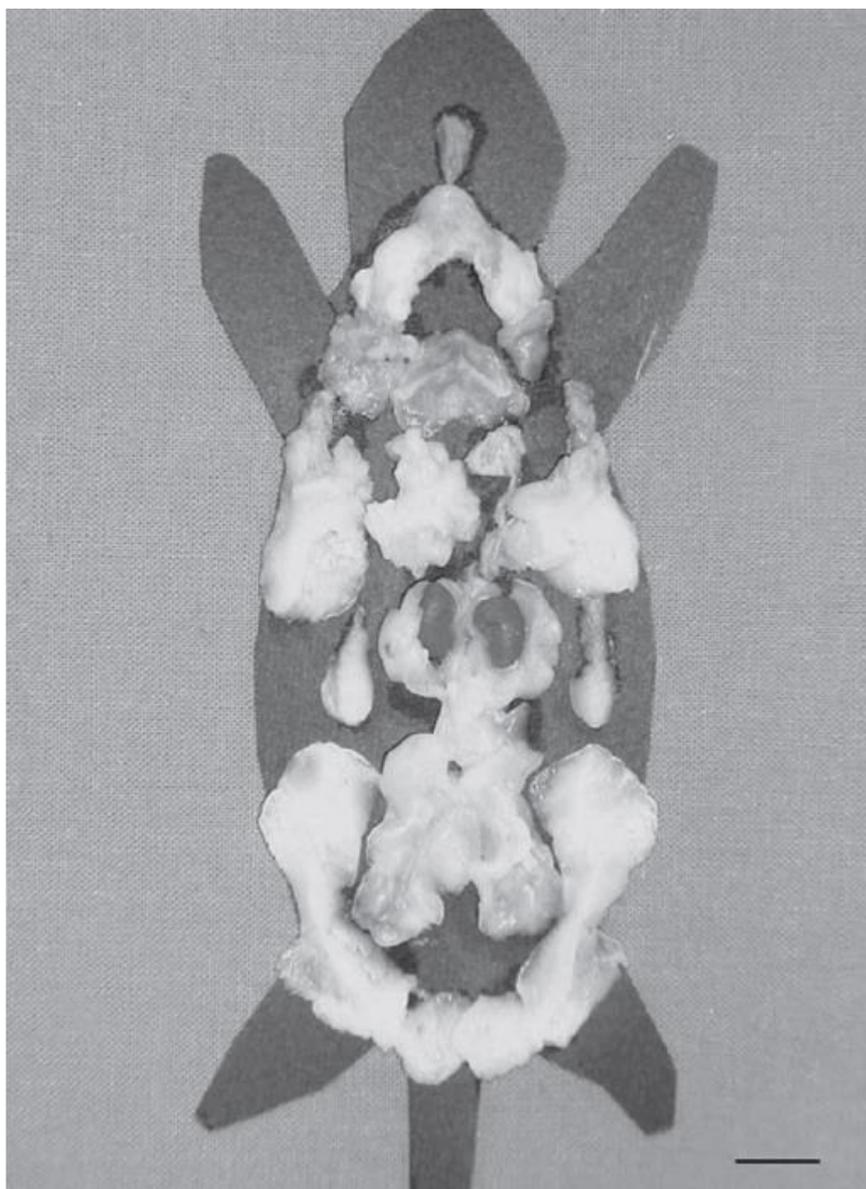


Рисунок 20 – Анатомия жировой ткани у грызунов

Если говорить о человеке, то в висцеральном скоплении отличий нет, зато подкожное представлено непрерывно по всему телу и связано непосредственно с дермальной (кожной) жировой тканью, тогда как у грызунов между подкожным жиром и дермальным есть мышечная прослойка. Масса всего адипозного органа у мужчин составляет от 8% до 18%, а у женщин от 14 до 28% [64].

Клетки жировой ткани называются адипоцитами. Адипозный орган состоит из двух типов жировых тканей – белой и бурой. Белая жировая ткань

(БелЖТ) образована белыми адипоцитами, бурая жировая ткань (БЖТ) – бурыми адипоцитами. Относительное содержание обоих типов адипоцитов заложено генетически и также зависит от нескольких факторов: возраста, пола, окружающей среды и питания [29].

Бурые адипоциты присутствуют во всех вышеупомянутых скоплениях, но наиболее распространены в межлопаточной, подмышечной и шейной областях. Четких анатомических границ между бурой и белой жировой тканью нет, во многих частях БелЖТ присутствуют бурые адипоциты. Белые адипоциты встречаются даже в коже, тимусе, лимфоузлах, костном мозге, параситовидной и поджелудочной железах [29].

По строению белые и бурые адипоциты отличаются. В белых почти вся цитоплазма занята одной большой липидной каплей и в них присутствует очень мало митохондрий. Остальные органеллы конечно же есть, но их можно увидеть только в электронный микроскоп (за исключением ядра, которое видно и в световой) (Рис. 21) [29].

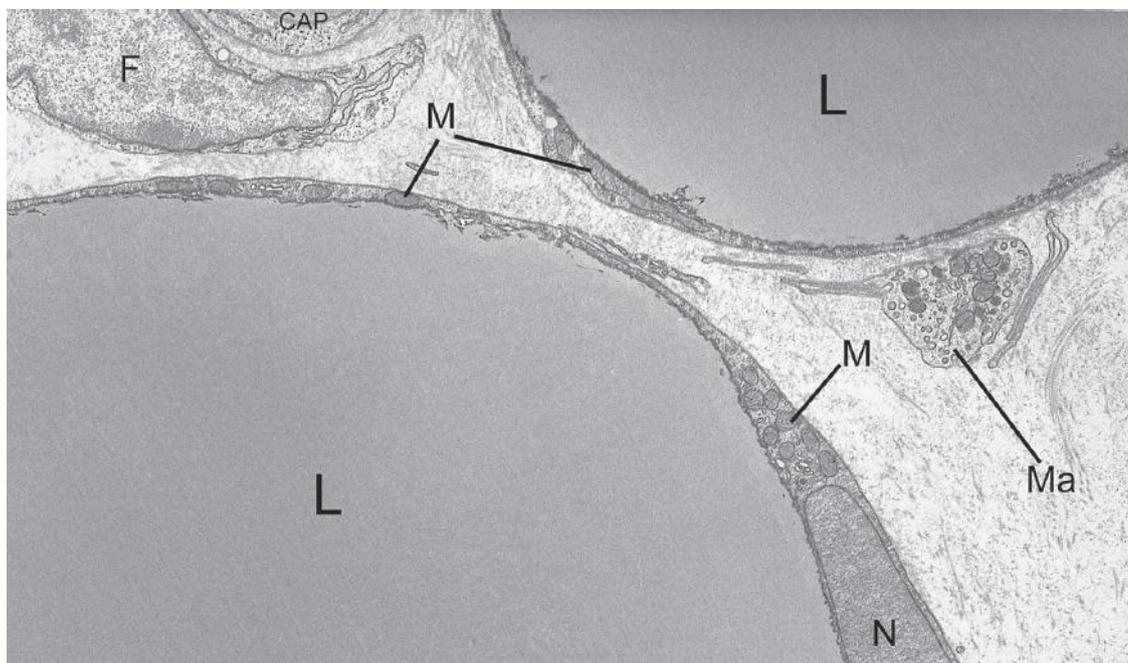


Рисунок 21 – Электронная микроскопия белого адипоцита (L – липидная капля, M – митохондрия, N – ядро)

Бурые адипоциты имеют лишь одно сходство с белыми – они оба накапливают триглицериды (жиры). Но в бурых адипоцитах имеется множество мелких липидных капель, в отличие от белых. Сами клетки меньше по размеру в два раза. Самая важная органелла в бурых адипоцитах – это митохондрия, их очень много в клетке, поэтому они и приобретают бурый цвет (Рис. 22) [29].

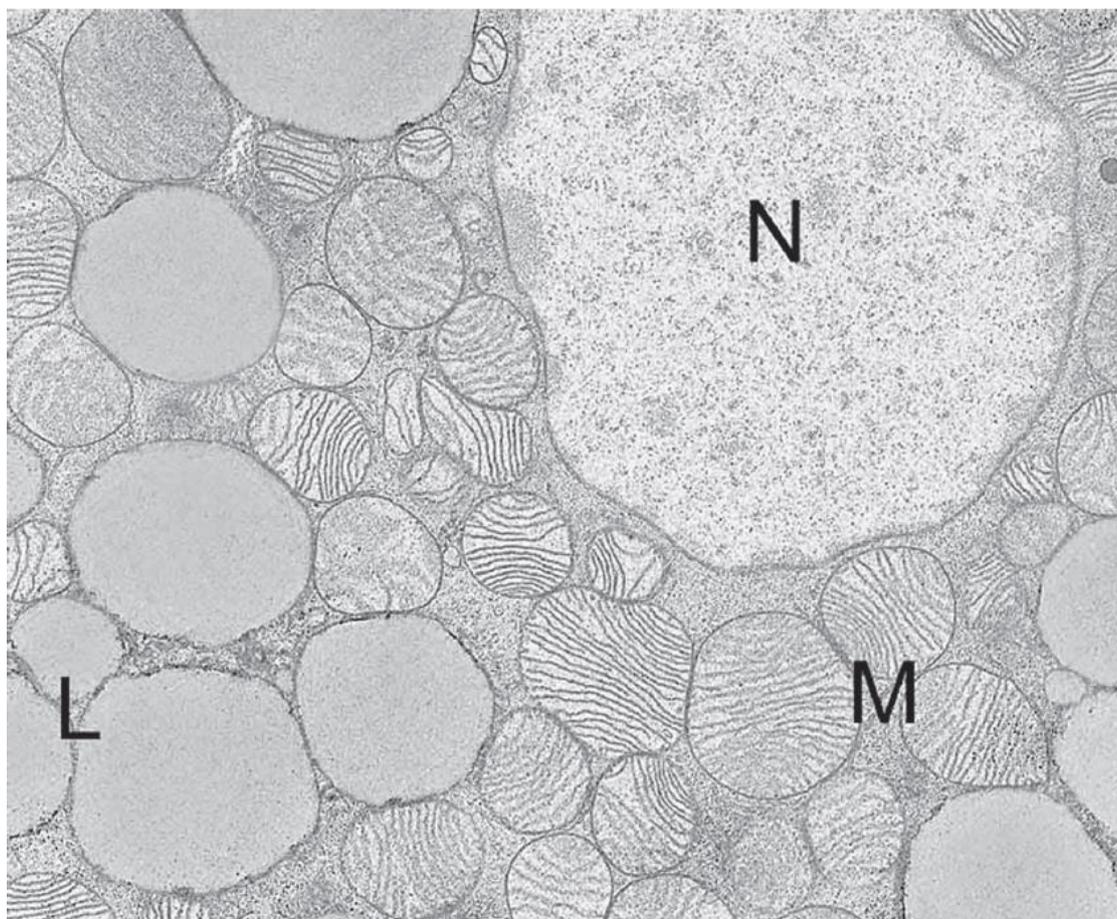


Рисунок 22 – Электронная микроскопия бурого адипоцита (L – липидная капля, M – митохондрия, N - ядро)

В основном, БелЖТ обладает функцией «выживания» в разные периоды голодания, т.е. она снабжает организм энергией. Функция же БЖТ сводится к несократительному термогенезу. Здесь следует напомнить, что есть два типа производства тепла – сократительный и несократительный термогенез. Первый происходит за счет мышечной дрожи, а за второй

отвечает БЖТ. Но каким образом это происходит? Данная функция БЖТ обусловлена одним уникальным белком, который является специфическим маркером этой ткани – разобщающий белок 1 (РБ1) [22]. РБ1 находится на внутренней мембране митохондрии рядом с важным белковым комплексом – дыхательной цепью, или цепью переноса электронов. Именно в ней осуществляется процесс клеточного дыхания. Вдаваться в детали всего процесса не будем. Важно понять лишь то, что в конце концов за счет переноса электронов по этой цепи синтезируется АТФ; и на ее синтез, а также на перенос энергетических субстратов через мембрану митохондрии тратится 65-70% всей энергии электронов и 30-35% этой энергии рассеивается в виде тепла, которое идет на поддержание температуры тела теплокровными животными. За время переноса электронов по дыхательной цепи создается градиент протонов H^+ на внутренней и внешней стороне от внутренней мембраны митохондрии. Этот градиент дает энергию для синтеза АТФ, поскольку в митохондрии только фермент АТФ-синтаза может пропускать протоны H^+ обратно в матрикс. В итоге получается, что окисление субстратов и синтез АТФ путем фосфорилирования АДФ сопряжены. Это называется сопряжением дыхания (окисления) и фосфорилирования. Но этот процесс может быть разобщенным, об этом нам и говорит название белка РБ1. РБ1 представляет собой трансмембранный белковый канал, как и АТФ-синтаза. Но РБ1 может переносить протоны H^+ обратно в матрикс с помощью анионов жирных кислот без синтеза АТФ. Уменьшая градиент H^+ , снижается и синтез АТФ, повышается концентрация АДФ и количество поглощаемого кислорода увеличивается. Этот процесс называется разобщением дыхания и фосфорилирования и в данном процессе энергия электронов не тратится на синтез АТФ, а вся рассеивается в виде теплоты (Рис. 23) [7]. Перенос H^+ в матрикс из межмембранного пространства с целью увеличения продукции тепла и есть функция РБ1.

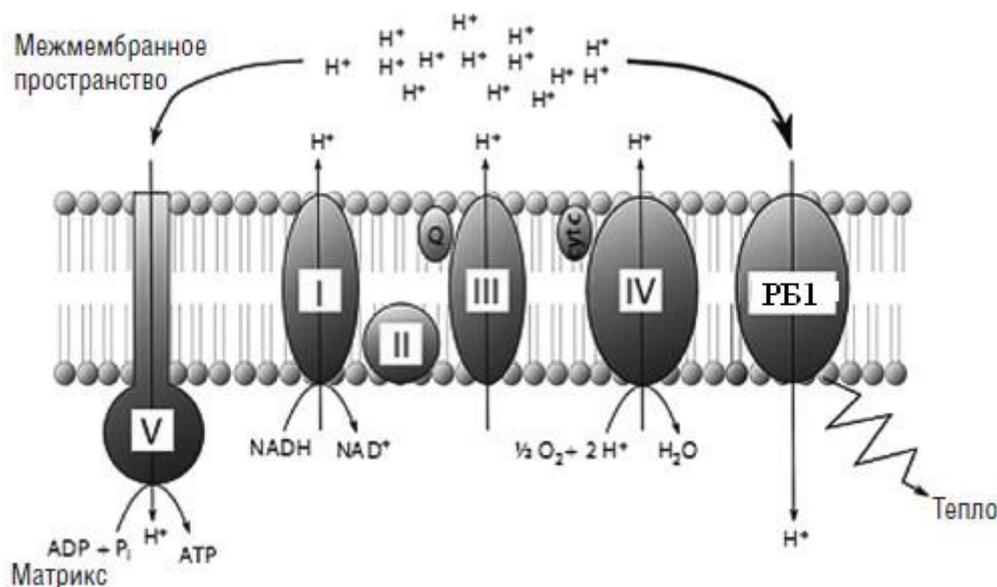


Рисунок 23 – Схема разобщения дыхания и фосфорилирования с помощью разобщающего белка 1 (РБ1) в ЦПЭ

Сигналом для активации бурых адипоцитов служит понижение температуры среды ниже термонеutralной. Термонеutralные условия среды – это та точка температуры, при которой организм не нуждается в дополнительном термогенезе. Для мышей это 30-34°C, для крыс 28°C, для человека 20-22°C. Низкие температуры активируют нервные волокна симпатической нервной системы, которые соединены с БЖТ и выделяют норадреналин, запускающий работу бурых адипоцитов. При постоянном холоде норадренергическая иннервация возрастает в БЖТ, а при голодании – в БелЖТ [78].

Итак, получается, что энергия липидов может запасаться в БелЖТ и тратиться в БЖТ. Эти функции сбалансированы и общий объем адипозного органа зависит также от равновесия активности БелЖТ/БЖТ. Генетически обусловленное отсутствие БЖТ вызывает ожирение, хотя отсутствие РБ1 приводит к большой чувствительности к холоду, но не к ожирению [38].

Функции адипозного органа не ограничиваются производством тепла и запасанием энергии. В 1994 году [88] была выявлена еще одна главная

функция адипозного органа – эндокринная. Белые адипоциты продуцируют «гормон аппетита» лептин, который влияет на пищевое поведение. Лептин относится к группе адипокинов – гормонов жировой ткани. Именно лептин дает чувство насыщения при приеме пищи, что спасает организм от ожирения. Он способствует активации термогенеза путем разобщения дыхания в БелЖТ. При снижении лептина и/или лептиновых рецепторов развивается ожирение [55]. Помимо этого, он рассматривается в качестве одного из факторов патогенеза сахарного диабета 2 типа, который тоже может быть следствием ожирения. Дело в том, что повышенный уровень лептина способствует снижению секреции инсулина и ингибирует действие инсулина на клетки печени, а также повышению инсулинорезистентности у инсулинзависимых тканей, т.е. ткани не реагируют на инсулин, в связи с чем устанавливается повышенный уровень глюкозы в крови и развивается диабет [82].

В добавок к этим функциям подкожная жировая ткань регулирует потоотделение организма путем продуцирования предсердного натрийуретического пептида, пептида С и ангиотензиногена-II, которые влияют на водно-солевой обмен, артериальное давление и свертываемость крови [70].

Адипозный орган продуцирует много адипокинов, которые контролируют углеводный и липидный обмен, свертываемость крови, кровяное давление и модуляцию стероидных гормонов. Производство всех этих адипокинов подтверждает концепцию о том, что адипозный орган выполняет эндокринную функцию [48].

Происхождение адипоцитов до сих пор до конца неизвестно, но *in vivo* (в клетке организма) и *in vitro* (в пробирке) процесс развития адипоцитов были описаны.

Для начала поговорим о белых адипоцитах. В первую неделю постнатального развития, т.е. после родов, большинство скоплений БелЖТ

состоят из предшественников белых адипоцитов – преадипоцитов – слабодифференцированных жировых клеток, не до конца сформировавшихся (Рис. 24).

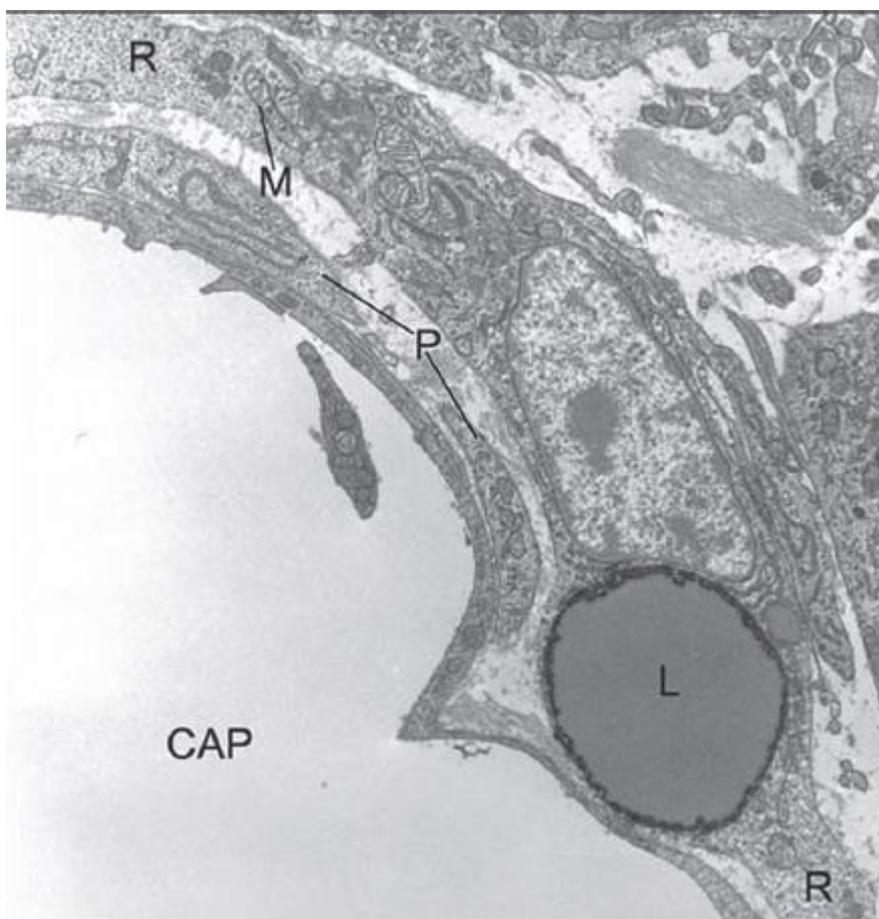


Рисунок 24 – Электронная микроскопия белых преадипоцитов (L – липидная капля, M – митохондрия, CAP – сосудистая стенка, R – рибосомы и полирибосомы)

Преадипоциты можно отличить от других типов клеток в ткани, потому что они окружены четкой базальной мембраной. В них часто та самая большая липидная капля окружена множеством мелких, но вскоре остается только одна [62].

В бурых преадипоцитах (Рис. 25) до РБ1 появляется морфологический маркер – претипичная митохондрия, которая отличается от зрелой. Далее происходит деление митохондрий и запасание липидов. Липидные капли маленькие и одинаковые по размеру, это отличает бурые преадипоциты от

белых. Далее притипичная митохондрия становится зрелой и в этот момент экспрессируется белок РБ1 [71].

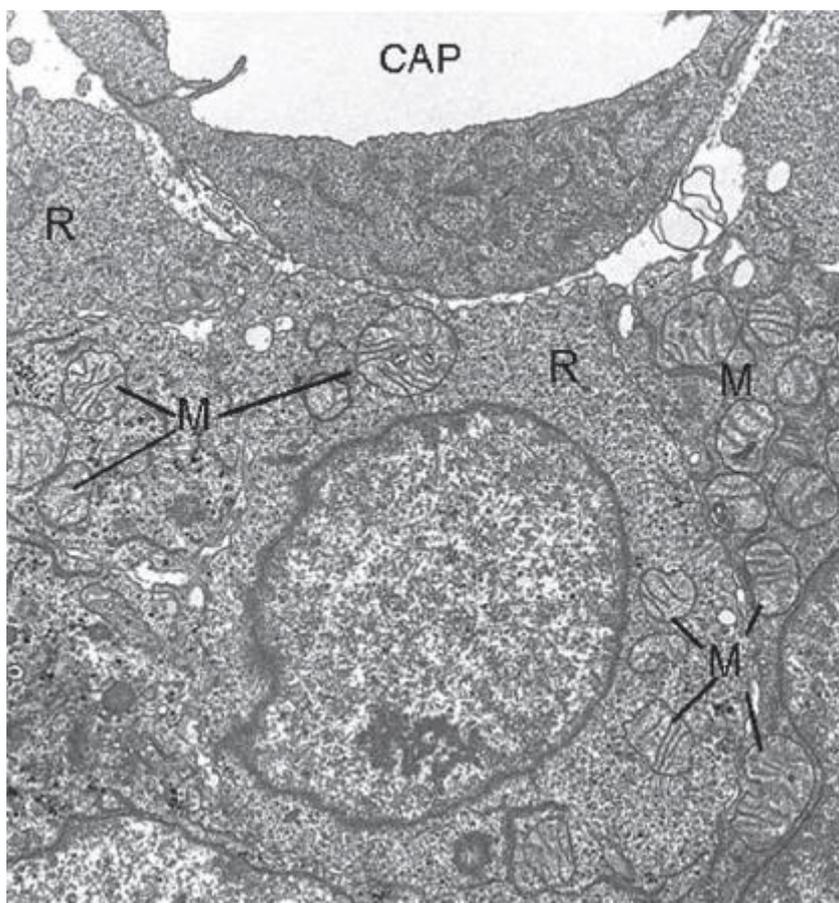


Рисунок 25 – Электронная микроскопия бурых преадипоцитов (M – митохондрия, CAP – сосудистая стенка, R – рибосомы, по центру – ядро клетки)

Белые адипоциты могут превращаться в бурые и наоборот в процессе трансдифференцировки. Трансдифференцировка – процесс трансформации одного типа клеток в другой.

Концепция адипозного органа предполагает, что все скопления вариабельны в плане типа адипоцитов и зависят от нескольких факторов, о которых говорилось выше. Белые адипоциты могут развиваться в скоплении БЖТ у животных, страдающих ожирением (либо генетическим, либо приобретенным). Также и бурые развиваются в депо БелЖТ во время холода (Рис. 26) [32] или агонистами (веществами, имеющими сходный эффект с эталоном; в данном случае эталоном является норадреналин) бета-3-

адренергических рецепторов, на которые действует норадреналин и способствует тем самым появлению новых бурых адипоцитов и/или увеличению экспрессии РБ1.

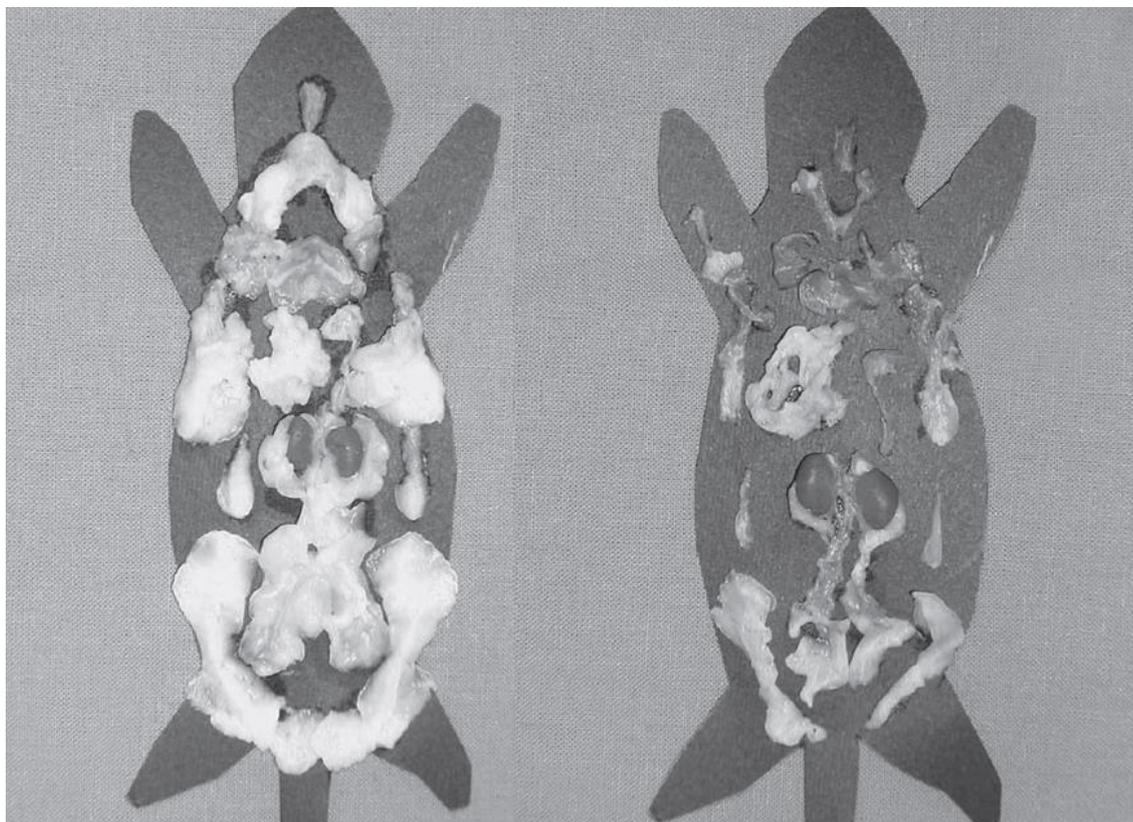


Рисунок 26 – Увеличение содержания БЖТ и сокращение БелЖТ во время адаптации к холодовым воздействиям. Слева - 26°C, справа - 6°C в течение 10 дней

Развитие бурых адипоцитов в БелЖТ улучшает общее состояние при ожирении и диабете [14]. После холодовых воздействий количество предшественников бурых адипоцитов и самих бурых адипоцитов возрастает. Это сопровождается появлением клеток с морфологическими характеристиками, которые являются промежуточными между белыми адипоцитами и бурыми, а также отличаются от бурых предадипоцитов. В этих клетках находится одна большая липидная капля [44], которую окружает множество маленьких. Митохондрий больше, чем в белых адипоцитах, но меньше, чем в бурых. Митохондрия по строению также находится между двумя типами адипоцитов. Предполагается, что такой

адипоцит является переходом от белого к бурому. Некоторые из этих клеток обнаружены в скоплениях БелЖТ при холодových воздействиях и чувствительны к РВ1. А развитие их никак не связано с процессами деления клетки. При холодových воздействиях увеличение бурых адипоцитов было равным уменьшению белым, что подтверждает процесс трансдифференцировки [41].

Было проведено исследование, в котором процесс трансдифференцировки белых адипоцитов в бурые запускали путем введения агонистов бета-3-адренорецепторов, и в ходе лечения повышалась экспрессия РВ1. Это показывает возможность лечения ожирения и диабета агонистами бета-3-адренорецепторов. Правда, вещество, дающее лечебный эффект для человека еще не идентифицировано [50].

Переходные клетки между белыми адипоцитами и бурыми были описаны еще в 80-90 гг. в БелЖТ [32]. Но в том время они не привлекли внимание ученых, поскольку вклад в термогенную активность БелЖТ в холод-индуцированный термогенез был небольшим [39]. Позднее же заметили, что у человека термогенная жировая ткань состоит именно из таких клеток, а не типичными бурыми адипоцитами [52]. В линиях животных с резистентностью к ожирению, вызываемым специальной диетой, заметили, что количество этих клеток было повышено. Этим клеткам присвоено название «бежевые адипоциты». Название отражает их цвет и говорит о том, что они темнее белых, но светлее бурых, т.е. можно сказать, что это переходная форма между белыми и бурыми адипоцитами.

Бежевые адипоциты по большому счету выявляются у лабораторных животных в подкожном паховом и реже в абдоминальном скоплении [32]. По морфологии они напоминают незрелые белые или малоактивные бурые адипоциты. Клетки больше бурого адипоцита, но меньше белого и содержит крупную липидную каплю, которая окружена множеством мелких [61].

Митохондрия по строению и содержанию РБ1 не отличается от типично бурого адипоцита [72]. Но суммарное количество снижено [58, 61, 72].

Поэтому скорость потребления кислорода жировой тканью с бежевыми адипоцитами лишь ненамного выше, чем в ткани без РБ1, а термогенные ответы на норадреналин в 5-6 раз слабее по сравнению с типичной БЖТ.

Онтогенез бурого и бежевого жира лучше всего изучен у лабораторных мышей. При рождении в первые недели бежевых адипоцитов достаточно мало, но максимальное содержание их достигается уже на 20-е сутки [84]. Эти сроки предопределены генетически и не влияют от температуры среды или питания [26]. Именно в этот период происходит выход молодых животных из гнезда и появляется потребность в высоком факультативном термогенезе. Но содержание бежевых адипоцитов после 3-х месяцев снижается максимально, тогда как типичные бурые адипоциты сохраняются в течение всей жизни животного [26, 84].

Содержание бежевых адипоцитов как и бурых увеличивается при стимуляции холодом [57]. Достаточно недельного курса ежедневных холодовых воздействий для стимулирования появления бежевых адипоцитов в паховом депо [69].

Остается открытым вопрос о путях появления бежевых адипоцитов при холодовой адаптации – из клеток-предшественников [53] или путем трансдифференцировки из белых адипоцитов [30]. Однако был проведен ряд экспериментов по изучению данного вопроса. Например, в экспериментах по трассированию популяции клеток-предшественников (трассирование – метод, направленный на выявление анатомических связей в ткани с помощью специальных меток), которые экспрессируют фактор роста тромбоцитов, введение мышам бета-3-адреноагонистов стимулировало усиленную пролиферацию и дифференцировку этих клеток по пути бежевых адипоцитов в абдоминальном депо [53]. Т.е. это подтверждает по крайней мере один из путей появления бежевых адипоцитов. Но теоретически оба пути появления

этих клеток могут проявляться в разной степени и в разных тканях (либо в одной в зависимости от наличия некоторых факторов) [68]. Было показано обратимое превращение между белыми и бежевыми адипоцитами также с использованием метода трассировки. Холодовая стимуляция вызывала рост бежевых адипоцитов, что прослеживалось по наличию в них специально введенной метки, однако затем наблюдалось сближение морфологии бежевых адипоцитов с белыми. Вторичная холодовая стимуляция вызывала появление новых бежевых адипоцитов и побурение «побелевших» бывших бежевых адипоцитов.

Помимо температурного фактора можно добиться увеличения бежевых адипоцитов путем пищевой рестрикции (сокращения потребляемой пищи) [54], а также использование эмбриональных индукторов, которые способствуют появлению бежевых адипоцитов в процессе онтогенеза – костных морфогенетических белков [65], фактора роста фибробластов-21 [42], сердечных пептидов (ANP/BNP) [19], гормона иризина, продуцируемого БЖТ и скелетными мышцами [20]. Эти агенты также стимулируют и рекрутирование типичного бурого жира. Смысл этих разнообразных способов стимуляции бурых и бежевых адипоцитов – понять все функции этих клеток и возможности их терапевтического использования.

Помимо лабораторных мышей, у человека также имеются бежевые адипоциты [2]. При этом их недостаток коррелирует с развитием ожирения [59]. В исследованиях бежевых и бурых адипоцитов у человека применяется метод позитронно-эмиссионной томографии с использованием ^{18}F -флюорозидезоксиглюкозы, специального маркера участков активного метаболизма [80]. Отрицательная корреляция между термогенной активностью жировой ткани и индекса массы тела подтверждает заметный вклад термогенных адипоцитов в энергообмен и показывает возможность их использования для медицинской коррекции метаболических нарушений.

Для того, чтобы решать проблемы метаболизма, необходимо выяснить природу термогенных адипоцитов у человека. Результаты исследований на культурах адипоцитов человека и на образцах жировых тканей показали, что в неонатальный период (первые 28 дней после рождения) межлопаточный жир состоит в основном из бурых адипоцитов, а образцы внутрибрюшного жира содержат исключительно бежевые адипоциты [52]. У взрослых бежевые адипоциты преобладают во всех скоплениях термогенного жира, небольшая популяция бурых адипоцитов была обнаружена в глубоко лежащих слоях шейного [33] и надключичного жира [47]. Соответственно, можно сделать вывод о том, что распределение бежевых адипоцитов у человека на ранних этапах онтогенеза сходно с таковым у лабораторных животных, причем сосуды, несущие кровь в мозг и обратно на протяжении всей жизни окружены типичными бурыми адипоцитами.

Количественная оценка суммарного вклада термогенной жировой ткани в энергообмен также является одной из задач медицины. Некоторые исследования не исключают, что снижение активности термогенных адипоцитов при ожирении может быть следствием теплоизолирующих свойств тела [23]. Недавно предпринималась попытка оценить количественно вклад термогенных адипоцитов человека в энергообмен. Но эксперимент не дал убедительных аргументов в пользу значимого вклада данных клеток даже в холод-индуцированный термогенез. Вклад термогенных адипоцитов в холод-индуцированный термогенез составил всего около 5% [56]. С другой стороны, термогенез может оказаться не единственной и не основной составляющей позитивного влияния бежевых адипоцитов на энергообмен. К этому стоит еще добавить, что в последние годы накопились сведения об участии бежевых адипоцитов в регуляции тканевого гомеостаза жировых депо, в регуляции углеводного и липидного обменов как на местном, так и на системном уровне [37].

2.4.2. Протеомные исследования в лаборатории биохимии и физиологии энергообмена КГПУ им. В.П. Астафьева

Накапливающиеся сведения о положительном влиянии бежевых адипоцитов на показатели метаболического здоровья стимулируют интерес 1) к факторам, стимулирующим развитие этих клеток в адипозном органе человека и животных, 2) к сопровождающим появлению этих клеток перестройкам метаболизма, межклеточных взаимодействий в жировых депо – тканевому ремоделированию, как принято сейчас говорить в научной литературе.

Факторы, индуцирующие развитие термогенных адипоцитов, на сегодняшний день лучше всего изучены в паховом жировом скоплении. Из средовых факторов к ним относятся низкие температуры [57] и пищевая рестрикция [54], как правило, в природе эти факторы действуют одновременно. Причем в отличие от висцерального в подкожном жире относительно небольшие холодовые воздействия стимулируют появление бежевых адипоцитов. В наших экспериментах холодовая стимуляция проводилась регулярным ежесуточным помещением лабораторных мышей в холодильную камеру с температурой 5-6 °С в течение 2-х мес. Относительно слабые низкотемпературные воздействия стимулируют аппетит, и, как сообщалось, в лабораторном эксперименте потребление корма животным может возрастать в большей степени чем требуется для компенсации теплопотерь. Чтобы исключить рост жировой ткани в условиях слабой холодовой стимуляции, и чтобы наша модель была адекватна условиям природной среды, опытной группе мышей количество предоставляемого корма ограничивали на 20% по сравнению со съедаемым количеством в контрольной группе животных, постоянно содержащейся при 23°С. Как обсуждалось в предыдущих лекциях, современным, наиболее информативным методом для выяснения полной картины изменений той или

иной структуры организма является протеомный масс-спектрометрический анализ.

Протеомное профилирование и сравнительный анализ образцов пахового жира этих двух групп мышей выполнен по 1249 белкам на базе российско-канадской ассоциированной лаборатории Биомет. Полученные результаты 1) подтвердили появление бежевых адипоцитов в паховом жире под влиянием наших экспериментальных воздействий. Разобщающий белок 1 присутствовал во всех пробах пахового жира экспериментальной группы животных, тогда как ни в одной пробе контрольных мышей его не удалось обнаружить. Необходимым условием работы разобщающего белка и генерации им тепла является высокая интенсивность окислительных процессов в адипоцитах. Поэтому не удивительно, что его появление сочеталось с усиленной экспрессией белков, участвующих в окислении жирных кислот и в переносе электронов по электронтранспортной цепи. Еще более обширной среди гиперэкспрессированных белков оказалась группа ключевых ферментов важных анаболических путей. Это пути синтеза рибозы и дезоксирибозы - необходимых компонентов нуклеотидов, эффективного восстановителя НАДФН, жирных кислот из поступающей в клетки глюкозы. Детальный сравнительный анализ протеомов, позволяет воссоздать картину разнообразных превращений метаболитов, и некоторые стороны этих превращений удивительны и не легко вписываются в наши представления о клеточном метаболизме. Для биосинтезов требуется энергия, поэтому содержание АТФ-синтазы и белка, транспортирующего из митохондрии АТФ в обмен на АДФ, в смешанной популяции клеток пахового жира оказалось повышенным. Другой гиперэкспрессированный в результате наших экспериментальных воздействий комплекс митохондриальных переносчиков – это АДФ/АТФ-транслоказа 2 во внутренней митохондриальной мембране и особый зависящий от величины протонного градиента канал в наружной митохондриальной мембране. Этот сложный

белковый комплекс может направлять АТФ в пути метаболизма, связанные с биосинтезом нуклеотидов, антиоксидантов, минуя другие метаболические пути [67]. При этом стимулируется клеточное деление, рост, выживание. В некоторых случаях, например, в опухолевых клетках, где имеют место нарушения работы электрон-транспортной цепи, через этот комплекс реализуется обратный вход АТФ в митохондрию [28]. Значение этого пути транслокации АТФ и АДФ между митохондрией и цитоплазмой в адипоцитах не вполне ясно. Может ли он быть связан с трансформацией митохондрий в ходе трансдифференцировки белого адипоцита в бежевый – предстоит выяснить.

Факторы, стимулирующие развитие термогенных адипоцитов в висцеральном жировом депо до сих пор остаются до конца не изученными. Для решения этого вопроса нами был проведен эксперимент, в ходе которого лабораторные мыши адаптировались к трем температурным режимам: 23°C, 30°C и ежедневное помещение на 8 ч в холодильную камеру с температурой 10°C. Предполагалось, что, как и в паховом депо, пониженные температуры будут стимулировать рост содержания бежевых адипоцитов, о котором мы судим по увеличению содержания разобщающего белка. Разобщающий белок в этом эксперименте определяли со специфическими антителами в вестерн-блоттинге.

Тестируемые температурные режимы стимулировали значительные и разнонаправленные метаболические изменения в межлопаточном буром жире. При адаптации животных к термонеutralным условиям содержание ДНК, общего тканевого белка снижались в нем в 2 раза. При адаптации к холодным воздействиям содержание ДНК увеличивалось более чем в 2 раза, скорость потребления кислорода *in vitro* также увеличивалась. Все это говорит о том, что динамика метаболических показателей согласуется с функцией дополнительного холод-индуцированного термогенеза. По сравнению с бурым жиром в окологонадном жире изменения при обоих

видах температурных адаптаций были однонаправлены – снижение скорости потребления кислорода и содержания белка. При адаптации к 30°C эти изменения сочетались с 1,5-кратным увеличением массы окологонадного жирового депо, так что в пересчете на весь окологонадный жир, а не на мг ткани, эти показатели в «теплой» группе не отличались от контроля. В «холодной» группе масса окологонадного жира не отличалась от контроля, тенденция к снижению энергообмена и общего белка сохранялась при расчете и на мг ткани, и на все скопление. Можно предположить, что такая динамика показателей обусловлена усилением синтеза липидов, что при свободном доступе к корму вполне естественная реакция на холодовые воздействия. Маркер бежевых адипоцитов белок РБ1 определялся в пробах окологонадного жира во всех группах животных. Интенсивность полосы UCP1 в группе мышей, адаптированных к холоду, была выше, а в группе животных, содержащихся при 30°C, ниже, чем в контроле (Рис. 20-22).

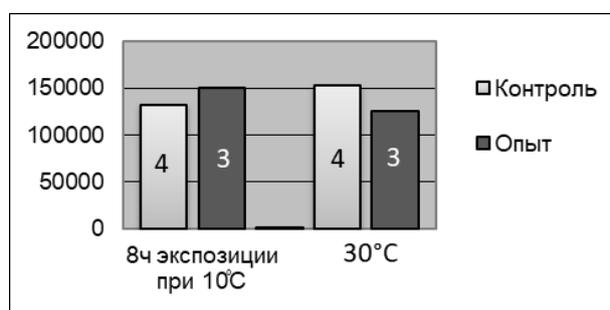


Рисунок 20 - Интенсивность полосы белка UCP1 (y.e.) в окологонадной жировой ткани животных, содержащихся при разных температурных режимах

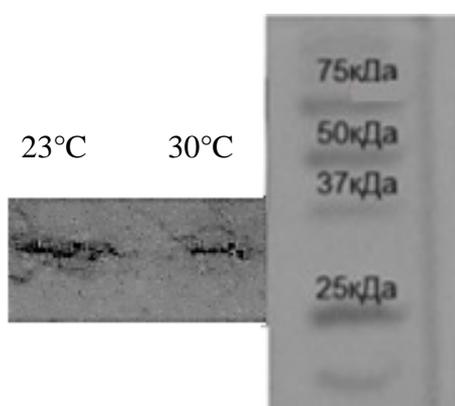


Рисунок 21 - РБ1 в о/гонадной жировой ткани мышей ICR при адаптации к термонейтральным условиям

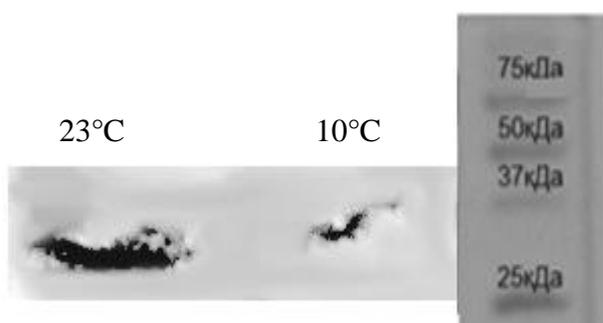


Рисунок 22 - РБ1 в о/гонадной жировой ткани мышей ICR при адаптации к низким температурам

В итоге, полученные результаты не согласуются с предположениями о терморегуляторной функции бежевых адипоцитов абдоминальной жировой ткани, либо используемые в работе холодовые нагрузки недостаточны для заметной стимуляции термогенеза в этой популяции РБ1-позитивных клеток.

Учитывая локализацию этой популяции бежевых адипоцитов в ядре тела, накапливающиеся данные об их стимуляции в условиях пищевой рестрикции [54], можно предположить, что слабый локальный термогенез в них через подогрев чувствительных нервных окончаний может представлять обратную связь для совместной настройки гипоталамических центров терморегуляции и пищевого поведения.

Заканчивая этот курс, хотелось бы подвести итог. Сравнительный анализ полных клеточных протеомов дает единовременную комплексную картину генной экспрессии, по которой можно судить о состоянии основных функциональных систем клетки в разных состояниях и условиях. Поэтому протеомику по праву можно назвать мостом между геномикой и физиологией. На данный момент метаболические нарушения, вызванные патологией жировых тканей, является «горячей» точкой физиологии и медицины. В проводимых в настоящее время протеомных исследованиях жировых тканей выделяется несколько направлений: изучение динамики клеточного протеома в ходе развития адипоцитов по белому или бурому пути; сравнительный анализ протеомов клеточных органелл БелЖТ и БЖТ; характеристика протеомов интактной БелЖТ или БЖТ; поиск информативных биомаркеров метаболических нарушений, прежде всего инсулинорезистентности, которая вызывает сахарный диабет 2 типа.

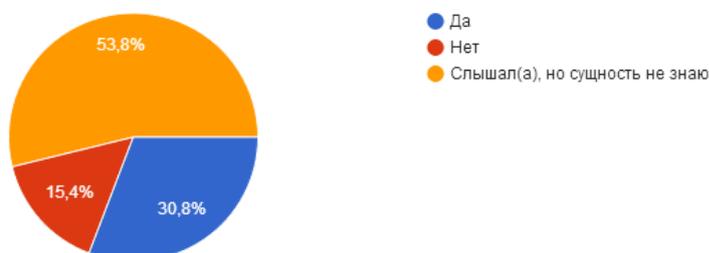
Благодаря быстрому развитию методов протеомики эти направления усиленно изучаются и происходит решение многих биологических и медицинских задач. Помимо белков было выявлено много генов-мишеней, которые экспрессируют здоровые и патогенные белки. Патофизиологические механизмы ожирения и связанных с ним заболеваний были частично

выяснены протеомными методами. Тем не менее, остается много нерешенных задач, которые стоит решить [51].

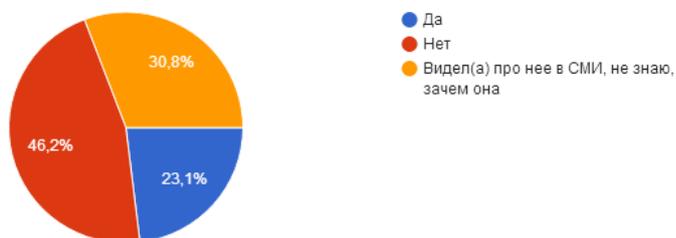
Глава III. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ АПРОБАЦИИ НАУЧНО-ПОПУЛЯРНЫХ ЛЕКЦИЙ

Часть курса лекций была апробирована в 10Б классе МАОУ СШ «№153» в рамках педагогической практики, проходящей с 07.11.17 г. по 18.12.17 г. Перед апробацией было проведено анкетирование обучающихся на одном из уроков биологии. Анкетирование было направлено на оценку осведомленности обучающихся о новых достижениях и направлениях молекулярной биологии, а также включали вопросы, касающиеся источников научно-популярной информации. Ввиду большой загруженности обучающихся, анкеты были максимально упрощены, включали в себя 6 вопросов и поэтому процедура анкетирования не занимала много времени. Всего участвовало в анкетировании 20 человек. Результаты анкетирования представлены на следующих диаграммах (Рис. 23).

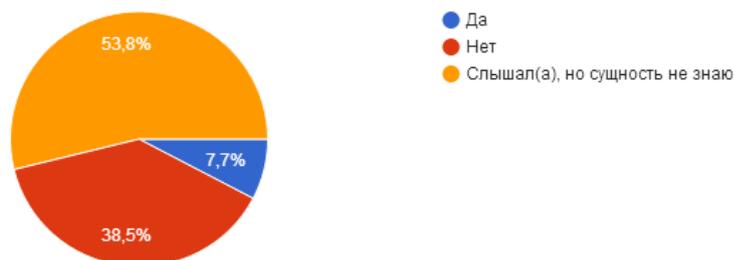
Знаете ли вы, что такое геномика?



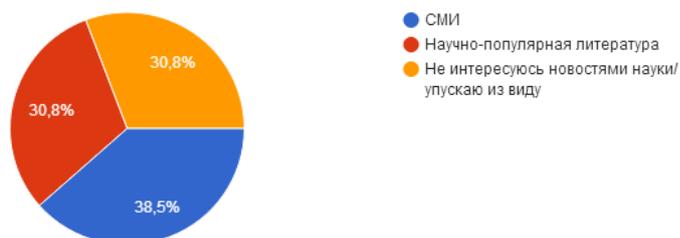
Знаете ли вы о программе "Геном человека"?



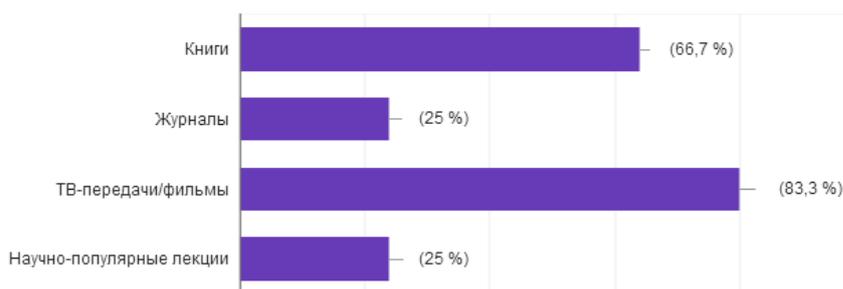
Знаете ли вы что такое протеомика?



Как вы узнаете последние достижения науки?



Какие виды научно-популярной литературы вы знаете?



Хотелось бы вам больше узнавать о достижениях науки в доступной форме?

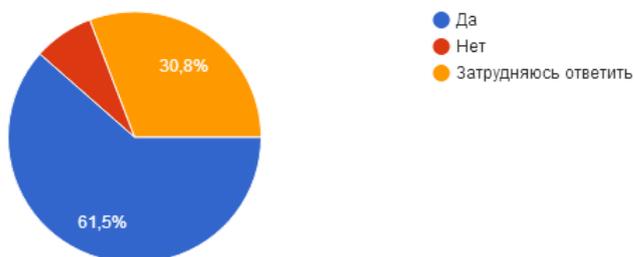


Рис. 23. Результаты анкетирования обучающихся 10Б класса МАОУ СШ «№153»

Исходя из результатов анкеты, был сделан вывод о том, что большая часть обучающихся заинтересована в том, чтобы получать научные знания доступным образом.

Видно, что большинство опрошенных узнает о достижениях науки через СМИ. Но, как показывает практика, не вся информация, получаемая из СМИ, является достоверной. Заинтересованность обучающихся послужило стимулом апробации лекций в школьной среде.

Апробированы были 2 лекции курса: «Почему белки являются главными молекулами в организме и какова их связь с эволюцией?» и «Тандем электрофореза и Вестерн-блоттинга. С чего все начиналось». Предварительно обучающиеся были приглашены обсудить после уроков некоторые современные проблемы молекулярной биологии. Присутствие на лекциях было добровольным. Всего на лекциях присутствовало 9 человек. Об их интересе к обсуждаемым проблемам свидетельствовали вопросы, задаваемые непосредственно по ходу лекций. Большой интерес вызвало у обучающихся наблюдение полимеризации акриламида, идентификация на высушенных гелях и блотах белковых полос, сопровождающие изложение материала второй лекции. Чтобы получить больше информации о том, насколько доступно содержание лекций для обучающихся старших классов, по окончании каждой из лекций обучающимся предлагалось добровольно пройти небольшой опрос в тестовой форме. Результаты опросника показали, что обучающиеся понимают и усваивают большую часть материалов.

Кроме апробации в условиях школы фрагмент лекции 4 о происхождении и онтогенетическом развитии жировых клеток был представлен студентам – первокурсникам на занятии по курсу возрастной физиологии. Особый интерес у студентов вызвал вопрос о межклеточных взаимодействиях в динамике дифференцировки бурых адипоцитов.

По итогам апробации были разработаны методические рекомендации.

3.1. Рекомендации к разработке и проведению научно-популярных лекций

Для составления научно-популярной литературы необходимо придерживаться трех рекомендаций:

1) Доступность содержания. Необходимо стараться писать популярное сочинение более литературным языком, но не забывать о научном ключе. Неизвестные термины и процессы объяснять тем, что известно читателю. Например, в лекции о ВЭЖХ/МС ионизацию веществ в масс-спектрометре мы объясняем по аналогии с бросанием кирпича в кирпичную стену и выбиванием кирпичей с верхнего края стены. Следует избегать формул и абстрактных цифр, это перегружает читателя или слушателя.

2) Последовательность содержания. В популярном изложении не должно быть той быстроты, которая есть в чисто научном труде. В популярном изложении каждая мысль должна быть развита подробно, чтобы слушатель успел утвердиться на ней, прежде чем речь пойдет о другом. Если утомлять слушателя слишком быстрыми переходами, то получится тот же результат, который произвело бы отсутствие мостиков: слушатель совершенно потеряет из виду общую связь ваших мыслей. Новые сведения должны сообщаться тогда, когда слушатель усвоил предыдущее.

3) Конкретика изложения. Популярное изложение должно избегать всякой отвлеченности. Каждое общее положение должно быть подтверждено фактами и пояснено частными примерами. Поэтому в нашем цикле после описания теории методов и их возможностей идут примеры конкретных исследований, подтверждающие широкие возможности методов протеомики. В частности, эффективность, высокую чувствительность и скорость метода без лишних слов подтверждает пример с продолжительностью исследования многочисленных проб дрожжевых белков.

4) При представлении научно-популярной лекции необходимо быть раскрепощенным, эмоциональным. Вести общение с аудиторией, заводить диалог, ставить проблему риторическими вопросами. Использовать мимику и жестикуляцию.

ВЫВОДЫ

1. Лекторий «Протеомика – новые горизонты молекулярной биологии» включает 4 научно-популярных лекции, содержание которых отражает основные проблемы описания и сравнительного анализа протеомов на клеточном и организменном уровне в онтогенезе и при воздействии средовых факторов, значение этих сведений для объяснения механизмов индивидуальной адаптации и их нарушений.
2. Первая лекция раскрывает структурные основы конформационной динамики белковой молекулы и ее связь с функцией, механизмы многократного увеличения разнообразия типов белков в протеоме по сравнению с геномом. Во второй и третьей лекциях представлены основы методов электрофореза, ВЭЖХ с масс-спектрометрией и вестерн-блоттинга, использующихся для описания белковых смесей и поиска в них интересных белковых маркеров
3. В лекции «Протеомный паспорт адипозного органа и медицина будущего» представлены результаты собственных исследований. В висцеральной жировой ткани в отличие от пахового депо экспрессия маркера термогенных адипоцитов разобщающего белка UCP1 не чувствительна к колебаниям температуры в диапазоне от 10°C до 30°C. Результаты масс-спектрометрического анализа паховой жировой ткани подтверждают холоду-индуцированную экспрессию в ней белка UCP1.
4. Лекции «Почему белки главные молекулы живого организма и какова их связь с эволюцией?» и «Тандем электрофореза и Вестерн-блоттинга – с чего все начиналось» апробированы в 10Б классе МАОУ СШ «№153». Лекция «Протеомный паспорт адипозного органа и медицина будущего»

апробирована у студентов I курса факультета биологии, географии и химии.
По итогам апробации подготовлены методические рекомендации.

Библиографический список

1. Дерюшева Е.И., Селиванова О.М., Сердюк И.Н. Петли и повороты в белках как отпечатки молекулярной эволюции // Успехи биологической химии. 2012. Т. 52. С. 177-202.
2. Елсукова Е.И., Медведев Л.Н. Новый тип термогенных адипоцитов: происхождение, свойства, функции // В мире научных открытий. 2016. Т. 80. № 8. С. 97-127.
3. Идентификация разобщающего белка UCP1 в абдоминальном жировом депо аутбредных лабораторных мышей при термонеutralных условиях / А.В. Якуненков // Тез. докл. на VI международ. научно-технич. конф. Высокие технологии в современной науке и технике, г. Томск, 27-29 нояб. 2017. С. 222-225.
4. Лазаревич Э.А. Искусство популяризации науки. М.: Наука, 1978. 226 с.
5. Малахова И.И., Егорова О.С., Горшков Н.И. Исследование тромбоцитарных белков по составу и молекулярной массе транспортными методами // Сорбционные и хроматографические процессы. 2012. Т. 12. № 6. С. 973-980.
6. Межерин С.В., Загороднюк И.В. Новый вид мышей рода *Apodemus* // Вестник зоологии. 1989. № 4. С. 55-59.
7. Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера. В 3 т. Т.1 / пер. с англ. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 694 с.
8. Николаев Е.Н., Попов И.А., Кононихин А.С. Анализ пептидов и белков методами масс-спектрометрии высокого разрешения // Успехи химии. 2012. Т. 81. № 11. С. 1051-1070.
9. Органическая химия: Учебник для вузов. В 2-х т. Т. 2 / под ред. В.Ф. Травень. М.: ИКЦ «Академкнига», 2004. 582 с.
10. Орлов В.И., Аратсков А.А. Жидкостная хроматография. Дзержинск : НТК «СИНТЕКО», 1997. 42 с.

11. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981. 288 с.
12. Сердюк И.Н. Структурированные белки и белки с внутренней неупорядоченностью // Мол. Биол. 2007. Т. 41. № 2. С. 297-313.
13. Эткинс П. Физическая химия : пер. К.П. Бутина. М.: Мир, 1980. 570 с.
14. Almidin K., Kahn C. R. Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice // Diabetes. 2004. V. 53. N 12. P. 3274-3285.
15. Arpino P.J. Combined liquid chromatography mass spectrometry. Part I. Coupling by means of a moving belt interface // Mass Spectrom. Rev. 1989. V. 8. N 1. P. 35-55.
16. Arpino P.J. Combined liquid chromatography mass spectrometry. Part II. Techniques and mechanisms of thermospray // Mass Spectrom. Rev. 1990. V. 9. N 6. P. 631-669.
17. Betz S. Disulfide bonds and the stability of globular proteins // Protein sci. 1993. V. 2. N 10. P. 1551-1558.
18. Biemann K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure // Biomed. Environ. Mass. Spectrom. 1988. V. 16. N 3. P. 99-111.
19. Bordicchia M., Liu D., Amri E., Ailhaud G. et al. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. // J. Clin. Invest. 2012. V. 122. P. 1022–1036.
20. Boström P., Wu J., Jedrychowski M., Korde A. et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis // Nature. 2012. V. 481. P. 463–468.
21. Budkevich T.V., Timchenko A.A., Tiktopulo E. Extended conformation of mammalian translation elongation factor 1A in solution // Biochemistry. 2002. V. 41. N 51. P. 15342-15349.
22. Cannon B., Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance // Physiol. Rev. 2004. V. 84. N 1. P. 277-359.

23. Cannon B., Nedergaard J. Yes, even human brown fat is on fire! // *J. Clin. Invest.* 2012. V. 122. P. 486–489.
24. Caprioli R., Suter M. Continuous-flow fast atom bombardment: recent advances and applications // *International journal of mass spectrometry and ion processes.* 1992. V. 118. P. 449-476.
25. Catherman A., Skinner O. Top-down proteomics: facts and perspectives // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. V. 445. N 4. P 683-693.
26. Chabowska-Kita A., Kozak L.P. The critical period for brown adipocyte development: genetic and environmental influences. // *Obesity (Silver Spring).* 2016. V. 24. N 2. P. 283–290.
27. Chait B., Kent S. Weighing naked proteins: practical, high-accuracy mass measurement of peptides and proteins // *Science.* 1992. V. 257. N 5078. P. 1885-1894.
28. Chevrollier A., Loiseau D., Reynier P., Stepien G. Adenine nucleotide translocase 2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2011. V. 1807. N 6. P. 562-567.
29. Cinti S. The adipose organ // *Disease models & mechanisms.* 2012. V. 5. N 5. P. 588-594.
30. Cinti S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ // *Am J. Physiol.* 2009. V. 297. P. 977–986.
31. Clayden J., Greeves N., Warren S. *Organic chemistry (1st ed.).* Oxford : Oxford university press, 2001. P. 386.
32. Cousin B., Cinti S., Morroni M. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization // *J. Cell Sci.* 1992. V. 103 (Pt 4). P. 931-942.
33. Cypess A., White A., Vernochet C. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat // *Nat Med.* 2013. V. 19. N 5. P. 635–639.

34. Ducret A., Eng J. High throughput protein characterization by automated reverse-phase chromatography/electrospray tandem mass spectrometry // *Protein sci.* 1998. V. 7. N 3. P. 706-719.
35. Dunker A., Brown J., Lawson J. Intrinsic disorder and protein function // *Biochemistry.* 2002. V. 41. N 21. P. 6573-6582.
36. Dunker A., Lawson J. Intrinsically disordered protein // *J. Mol. Graph. Model.* 2001. V. 19. N 1. P. 26-59.
37. Elsukova E.I., Medvedev L.N., Mizonova O.V. Physiological features of perigonadal adipose tissue containing uncoupling protein UCP1 in ICR mice // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. V. 161. N 3. P. 347–350.
38. Enerback S., Jacobsson A., Simpson E.M. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese // *Nature.* 1997. V. 387. N 6628. P. 90-94.
39. Foster D.O., Frydman M.L. Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluted from changes in tissue blood flow: the dominant role of brown adipose tissue in replacement of shivering by non-shivering thermogenesis. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1979. V. 57. P. 257–270.
40. Frazer R., MacRae T., Suzuki E. Chain conformation in the collagen molecule // *J. Mol. Biol.* 1979. V. 129. N 3. 463-481.
41. Granneman J.G., Li P., Zhu Z. metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue I: effects of beta3-adrenergic receptor activation // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005. V. 289. N 4. P. 608-616.
42. Hondares E., Gallego-Escuredo J., Flachs P., Frontini A. Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue // *Metabolism.* 2014. V. 63, P. 312–317.
43. Hunt D., Yates J. 3rd. Protein sequencing by tandem mass spectrometry // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. N 17. P. 6233-6237.

44. Hunte C., Richers S. Lipids and membrane protein structures // *Curr. Opin. Struct. Boil.* 2008. V. 18. N 4. P. 406-411.
45. Irimia M., Rukov J.L., Penny D. Functional and evolutionary analysis of alternatively spliced genes is consistent with an early eukaryotic origin of alternative splicing // *BMC Evolutionary biology.* 2007. V. 7. P. 188.
46. Jacquenet S., Mereau A., Stolfus C.M. A second exon splicing silencer within human immunodeficiency virus type 1 *tat* exon 2 represses splicing of *tat* mRNA and binds protein hnRNP H // *The journal of biological chemistry.* 2001. V. 276. N 44. P. 40464-40475.
47. Jespersen N., Larsen T., Peijs L. A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with beige in the supraclavicular region of adult humans // *Cell Metab.* 2013. V. 17. N 5. P. 798–805.
48. Kershaw E.E., Flier J.S. Adipose tissue as an endocrine organ // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004. V. 89. N 6. P. 2548-2556.
49. Kleparnik K. Recent advances in combination of capillary electrophoresis with mass spectrometry: methodology and theory // *Electrophoresis.* 2015. N 36. P. 159-178.
50. Larsen T.M., Toubro S., van Baak M.A. effect of a 28-d treatment with L-796568, a novel beta(3)-adrenergic receptor agonist, on energy expenditure and body composition in obese men // *Am. J. Clin. Nutr.* 2002. V. 76. P. 780-788.
51. Lee P., Swarbrick M.M., Ho K.K. Brown adipose tissue in adult humans: a metabolic renaissance // *Endocr. Rev.* 2013. V. 34. N 3. P. 413-438.
52. Lee P., Werner C.D., Kebebew E., Celi F.S. Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat // *Int. J. Obesity.* 2014. V. 38. P. 170–176.
53. Lee Y.H., Pefcova A.P., Mottillo E.P., Granneman J.G. In vitro identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta 3-

- adrenoceptor activation and high fat feeding // *Cell Metabolism*. 2012, V. 15. N 4. P. 480–491.
54. Mizonova O.V., Elsukova E.I., Medvedev L.N. Energy metabolism and biochemical features of adipose tissues in ICR mice after long-term calorie-restricted diet // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013. V. 155. N 6. P. 745–747.
55. Montague C.T., Farooqi I.S., Whitehead J.P. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans // *Nature*. 1997. V. 387. N 6636. P. 903-908.
56. Muzik O., Mangner T.J., Leonard W.R., Kumar A., Janisse J., Granneman J. ¹⁵O PET measurement of blood flow and oxygen consumption in cold-activated human brown fat // *J. Nucl. Med.* 2013. V. 54. N 4. P. 523–531.
57. Nedergaard J., Cannon B. The browning of white adipose tissue: some burning issues // *Cell Metab.* 2014. V. 20. N 3. P. 396–407.
58. Nedergaard J, Cannon B. UCP1 mRNA does not produce heat // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1831. N 5. P. 943–949.
59. Oberkofler H., Dallinger G., Liu Y.M. Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans // *J. Lipid. Res.* 1997. V. 38. P. 2125–2133.
60. O'Farrell P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins // *J. Biol. Chem.* 1975. V. 250. N 10. P. 4007–4021.
61. Okamatsu-Ogura Y., Fukano K., Tsubota A. Thermogenic ability of uncoupling protein 1 in beige adipocytes in mice // *PLoS One*. 2013. V. 8. e84229.
62. Pierleoni C., Verdenelli F. Castellucci M. Fibronectins and basal lamina molecules expression in human subcutaneous white adipose tissue // *Eur. J. Histochem.* 1998. V. 42. N 3. P. 183-188.
63. Ptitsyn O.B. Molten globule and protein folding // *Adv. Protein Chem.* 1995. V. 47. P. 183-229.

64. Pond C., Mattacks C. The anatomy of adipose tissue in captive Macaca monkeys and its implications for human biology // *Folia Primatol.* 1987. V. 48. N 3. P. 164-185.
65. Qian S.W., Tang Y., Li X., Liu Y., Zhang Y. et al. BMP4-mediated brown fatlike changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 798–807.
66. Receveur-Brechot V., Bouhris J., Universky V. Assessing protein disorder and induced folding // *Proteins.* 2006. V. 62. N 1. P. 24-45.
67. Roberts D.J., Miyamoto S. Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: acting on mitochondria and TORCing to autophagy // *Cell Death Differ.* 2015. V. 22. N 2. P. 364
68. Rosen E.D., Spiegelman B.M. What we talk about when we talk about fat? // *Cell.* 2014. V. 156. P. 20–44.
69. Rosenwald M., Perdikari A., Rüllicke T., Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. // *Nat. Cell. Biol.* 2013. V. 15. P. 659–667.
70. Sarzani R., Paci V.M., Zingaretti C.M. Fasting inhibits natriuretic peptides clearance receptor expression in rat adipose tissue // *Hypertens.* 1995. V. 13. N 11. P. 1241-1246.
71. Sbarbati A., Zancarano C., Cinti S. Brown adipose tissue: a scanning electron microscopic study of tissue and cultured adipocytes // *Acta Anat (Basel)*/ 1987. V. 128. N 1. P. 84-88.
72. Shabalina I.G., Petrovic N., Cannon B., Nedergaard J. UCP1 in Brite/Beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic // *Cell. Reports.* 2013. V. 5. P. 1196–1203.
73. Shen T. High-Performance Liquid Chromatography-Mass-Spectrometry in peptide and protein analysis // *Encyclopedia of analytical chemistry.* 2016. V. 7. P. 5845-5868.

74. Siuti N., Kelleher N. Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry // *Nat. Methods*. 2007. V. 4. N 10. P. 817-821.
75. Swiderek K., Lee T. The identification of peptide modifications derived from gel-separated proteins using electrospray triple quadrupole and ion trap analyses // *Electrophoresis*. 1998. V. 19. N 6. P. 989-997.
76. Timasheff S., Gorbunov M. Conformation of proteins // *Annu. Rev. Biochem.* 1967. V. 36. P. 13-54.
77. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1979. V. 76. N 9. P. 4350–4354.
78. Trayhurn P. Brown adipose tissue: from thermal physiology to bioenergetics // *J. of Biosci.* 1993. V. 18. N 2. P. 161-173.
79. Universky V., Gillespie J., Fink A. Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? // *Proteins*. 2000. V. 41. N 3. P. 415-427.
80. Van Marken Lichtenbelt W.D., Vanhommerig J.W., Smulders N.M. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men // *N. Engl. J. Med.* 2009. V. 360, P. 1500–1508.
81. Vestal M.L. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry // *Science*. 1984. V. 226. N 4672. P. 275-281.
82. Wang J., Obici S., Morgan K. Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance // *Diabetes*. 2001. V. 50. N 12. P. 2786-2791.
83. Wilkins M.R. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: mycoplasma genitalum // *Electroforesis*. 1995. V. 16. N 1. P. 1090-1094.
84. Xue B., Rim J.S., Kozak L.P. Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat // *J. Lipid Res.* 2007. V. 48. N 1. P. 41–51.

85. Yaoyang Z., Fonslow B., Yates J. 3rd. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics // *Chem. Rev.* 2013. V. 113. N 4. P. 2343-2394.
86. Yates J. 3rd. Pivotal role of computers and software in mass spectrometry – SEQUEST and 20 years of tandem MS database searching // *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2015. V. 26. N 11. P. 1804-1813.
87. Zahler A.M., Damgaard C.K., Kjems J. SC35 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B proteins bind to a juxtaposed exonic splicing enhancer/exonic splicing silencer element to regulative HIV-1 *tat* exon 2 splicing // *The journal of biological chemistry.* 2004. V. 279. N 11. P. 10077-10084.
88. Zhang Y., Proenca R., Maffei M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue // *Nature.* V. 372. N 6505. P. 425-432.
89. Ziganshin R., Arapidi G. New method for peptide desorption from abundant blood proteins for plasma/serum peptidome analyses by mass spectrometry // *J. Proteomics.* 2011. V. 74. N 5. 595-606.