



Методы биоинформатики в изучении обмена белков. Обзор.

С.В. Николаев

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia



Введение в биологию белкового обмена.

1. «Жизненный цикл» белков:
 - синтез белка; (схема)
 - функционирование белка; (основные типы белков, и их локализация)
 - распад белка. (схема)
5. Принципы регуляции содержания белков в клетке.

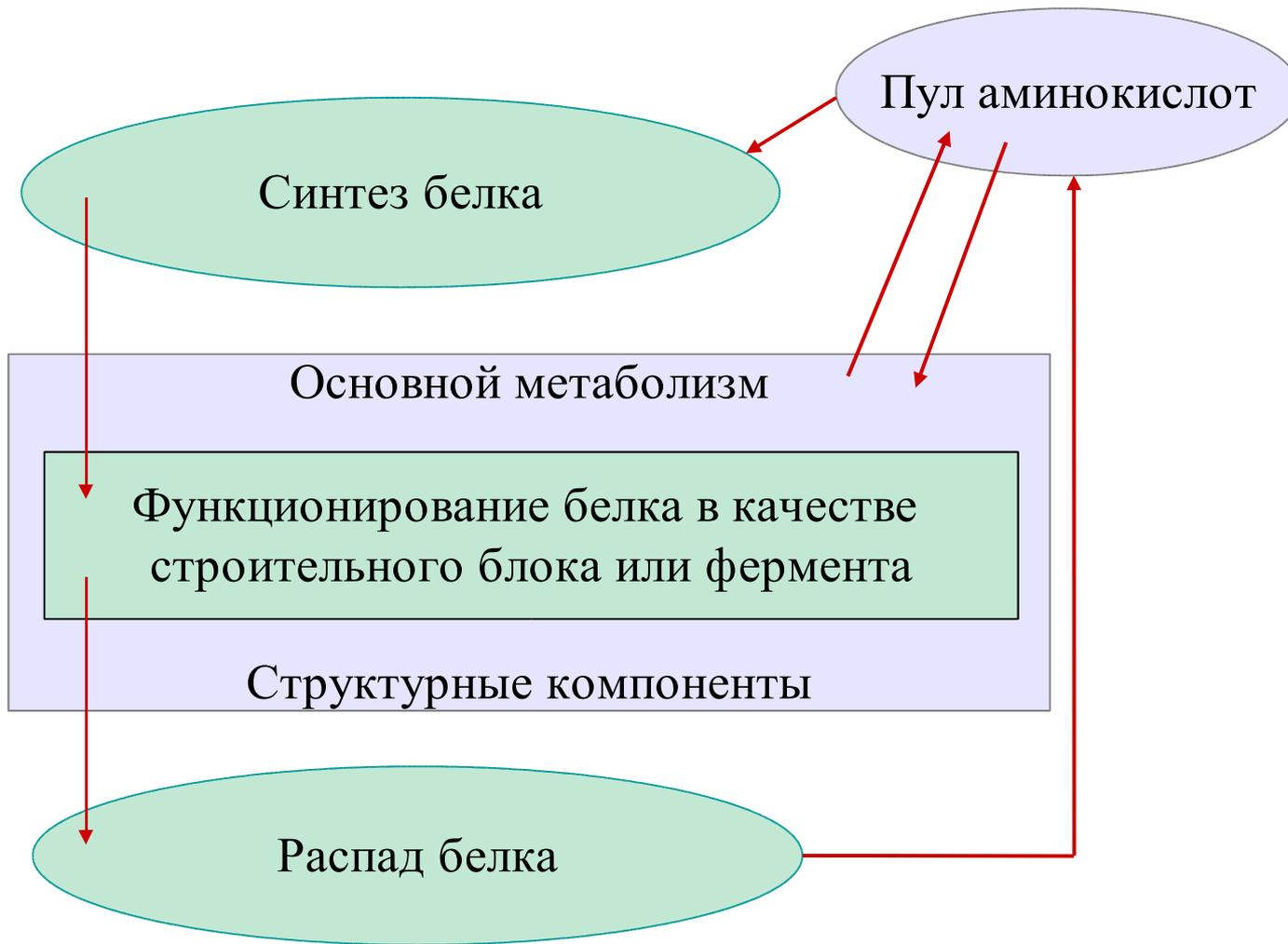
Некоторые задачи и методы их решения.

Уровень молекул:

1. Распознавание сигнальных пептидов и т.д....
2. Белок-белковые взаимодействия:
 - методы распознавания сайтов связывания;
 - методы, основанные на механич. свойствах макромолекул
3. Выявление внутримолекулярных сетей.

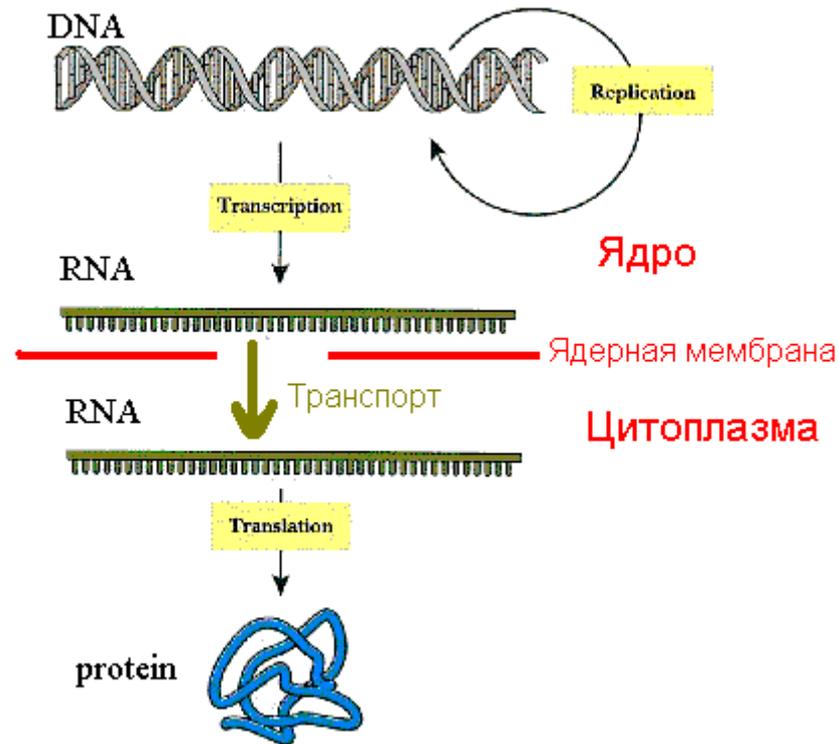
Уровень межмолекулярных сетей:

1. Кинетические модели метаболических сетей
2. Кинетические модели регуляции экспрессии генов
3. Статистическая механика сложных сетей. Модель Гудвина.
4. Сети Петри в моделировании белкового обмена.





Общая схема синтеза белка



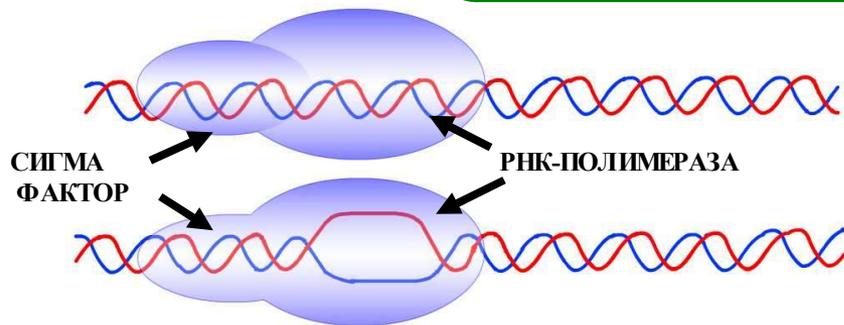
Адаптировано из:

URL Address: <http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/ribosome.htm>

Gwen V. Childs, Ph.D.

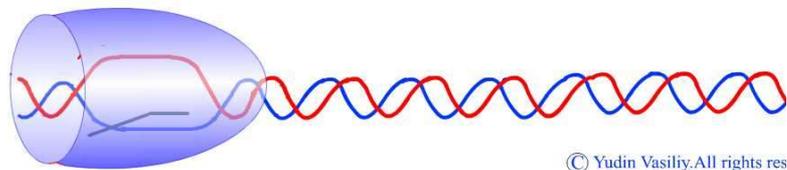


Четыре этапа транскрипции:



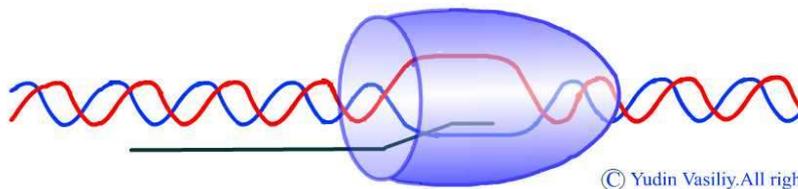
РАСПОЗНАВАНИЕ МАТРИЦЫ:

при участии сигма фактора (у *E. coli*) РНК полимераза связывается с ДНК и расплетает ДНК в точке инициации транскрипции



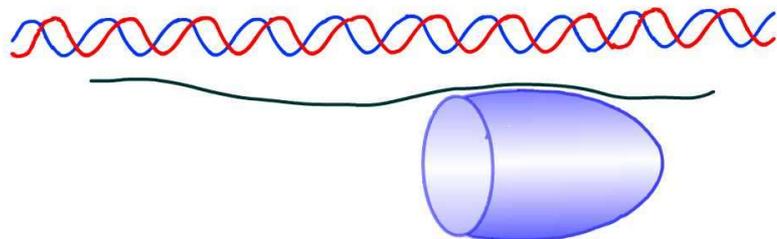
ИНИЦИАЦИЯ:

сигма фактор отсоединился и синтезирована цепь РНК (2-9 пар оснований)



ЭЛОНГАЦИЯ:

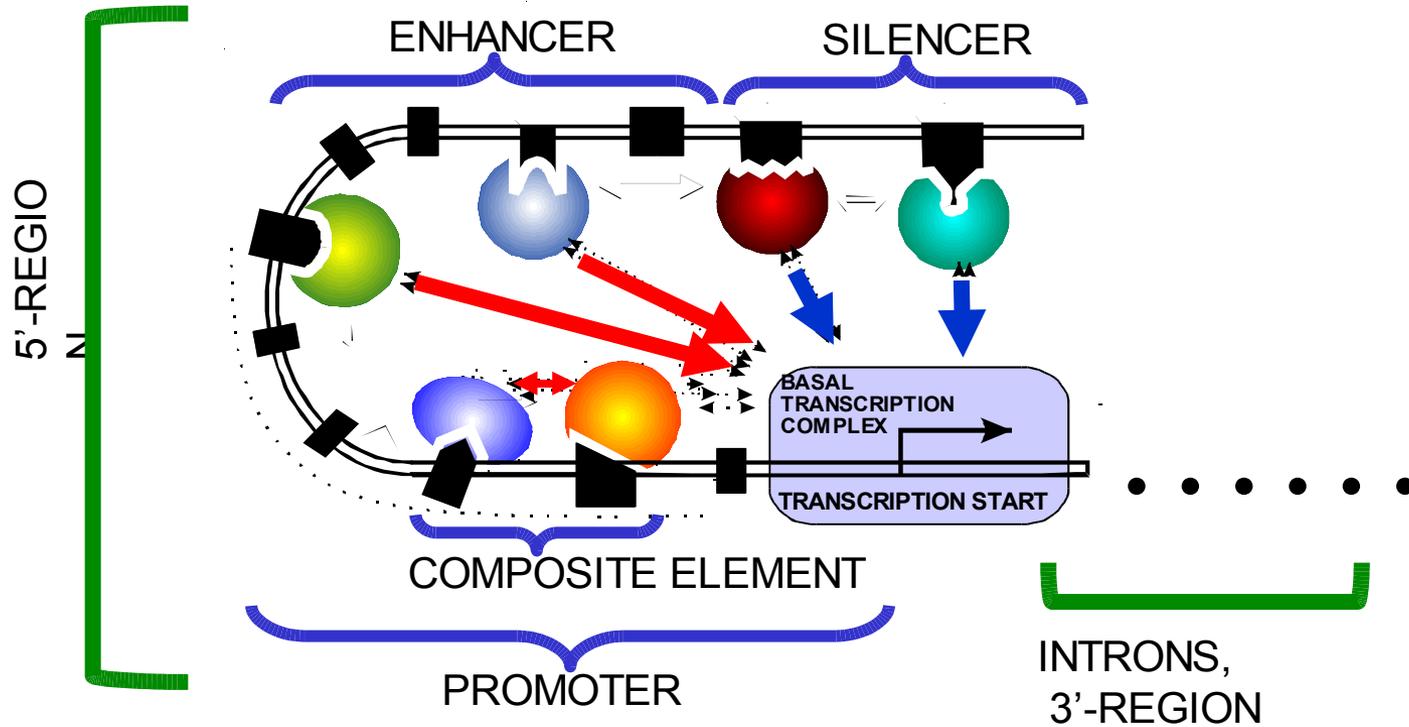
движение РНК полимеразы вдоль ДНК, расплетание ДНК, синтез РНК, заплетание ДНК



ТЕРМИНАЦИЯ: окончание транскрипции, распад комплекса ДНК-РНК-полимераза. Происходит после распознавания терминатора

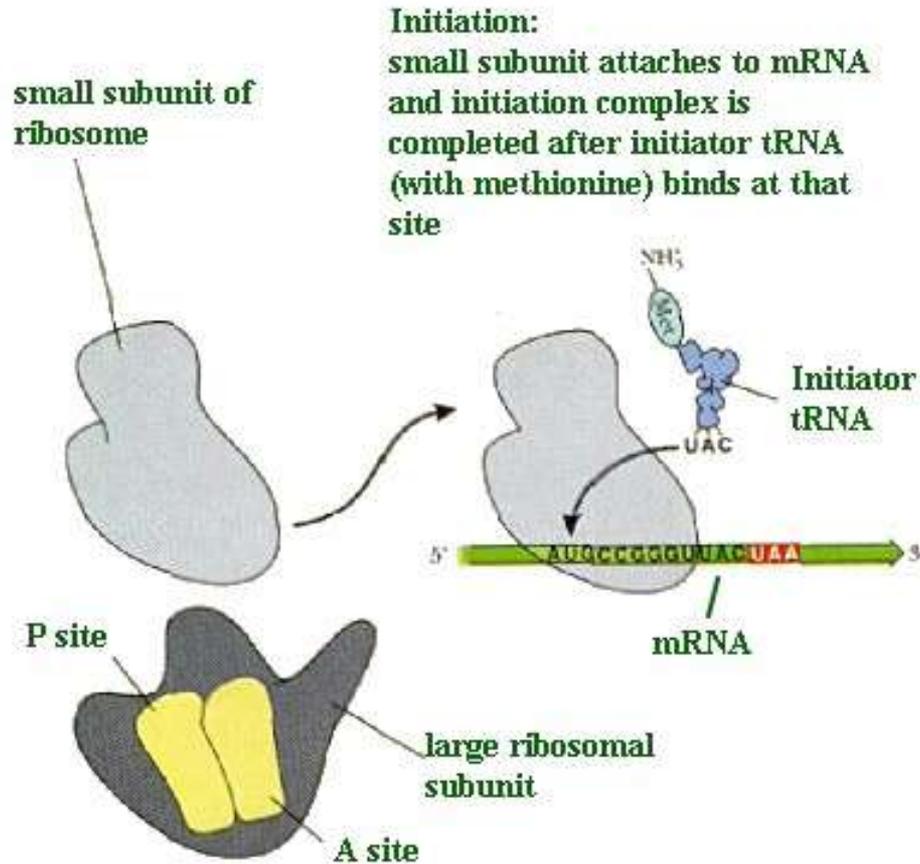


GENERAL MODEL OF EUKARYOTIC GENE TRANSCRIPTION REGULATION





Стадии трансляции. 1. Инициация трансляции.

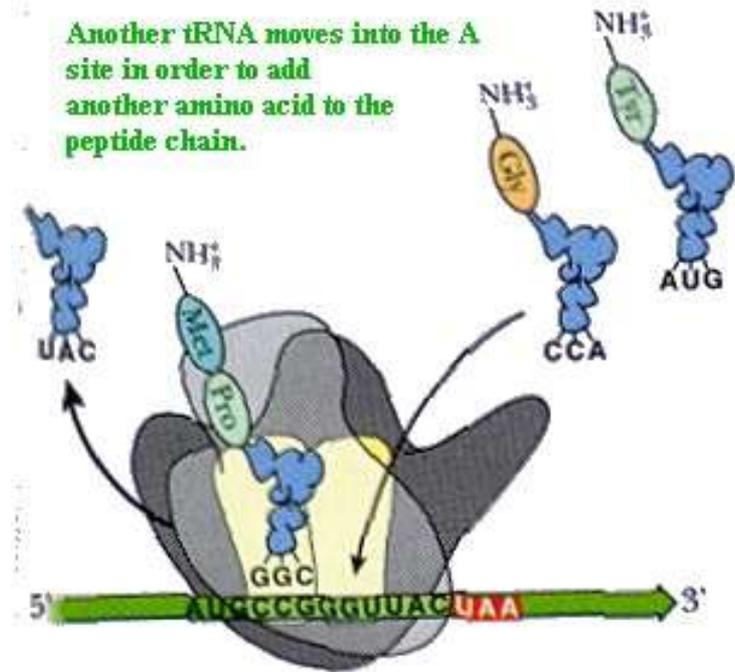
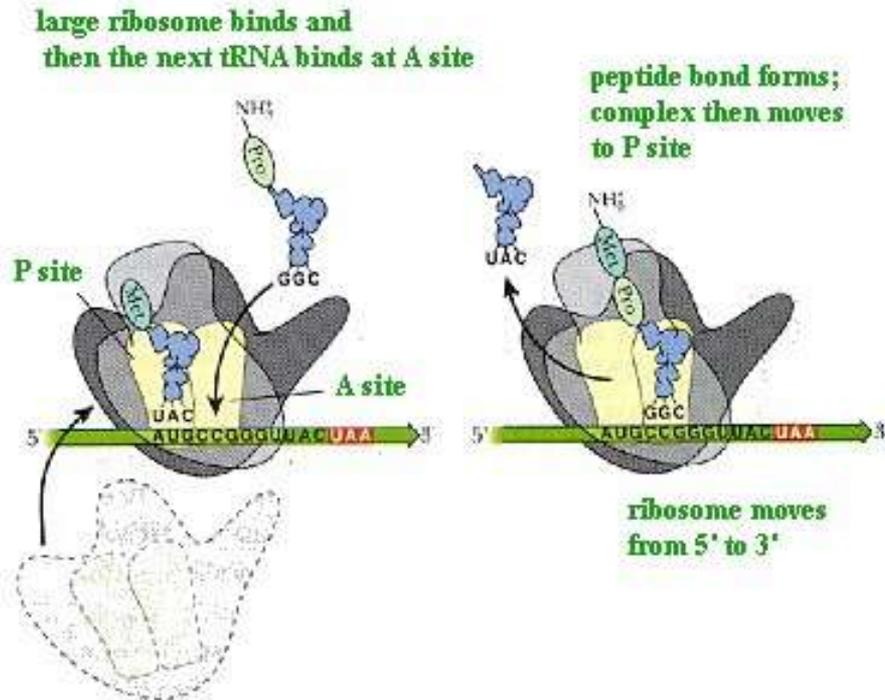


URL Address: <http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/ribosome.htm>

Gwen V. Childs, Ph.D.



Стадии трансляции. 2. Элонгация.

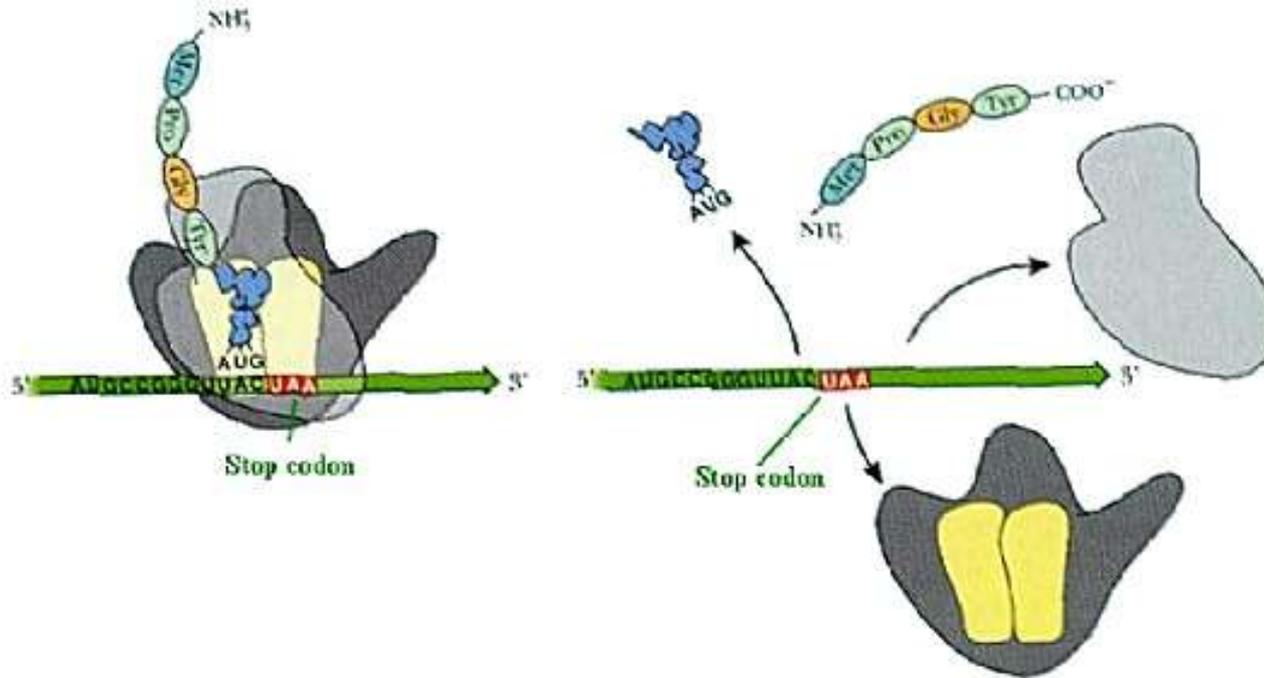


URL Address: <http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/ribosome.htm>
Gwen V. Childs, Ph.D.



Стадии трансляции. 3. Окончание трансляции.

When the ribosome encounters a stop codon (shown as the red triplet), there is no tRNA attracted and the ribosome separates and leaves the mRNA.

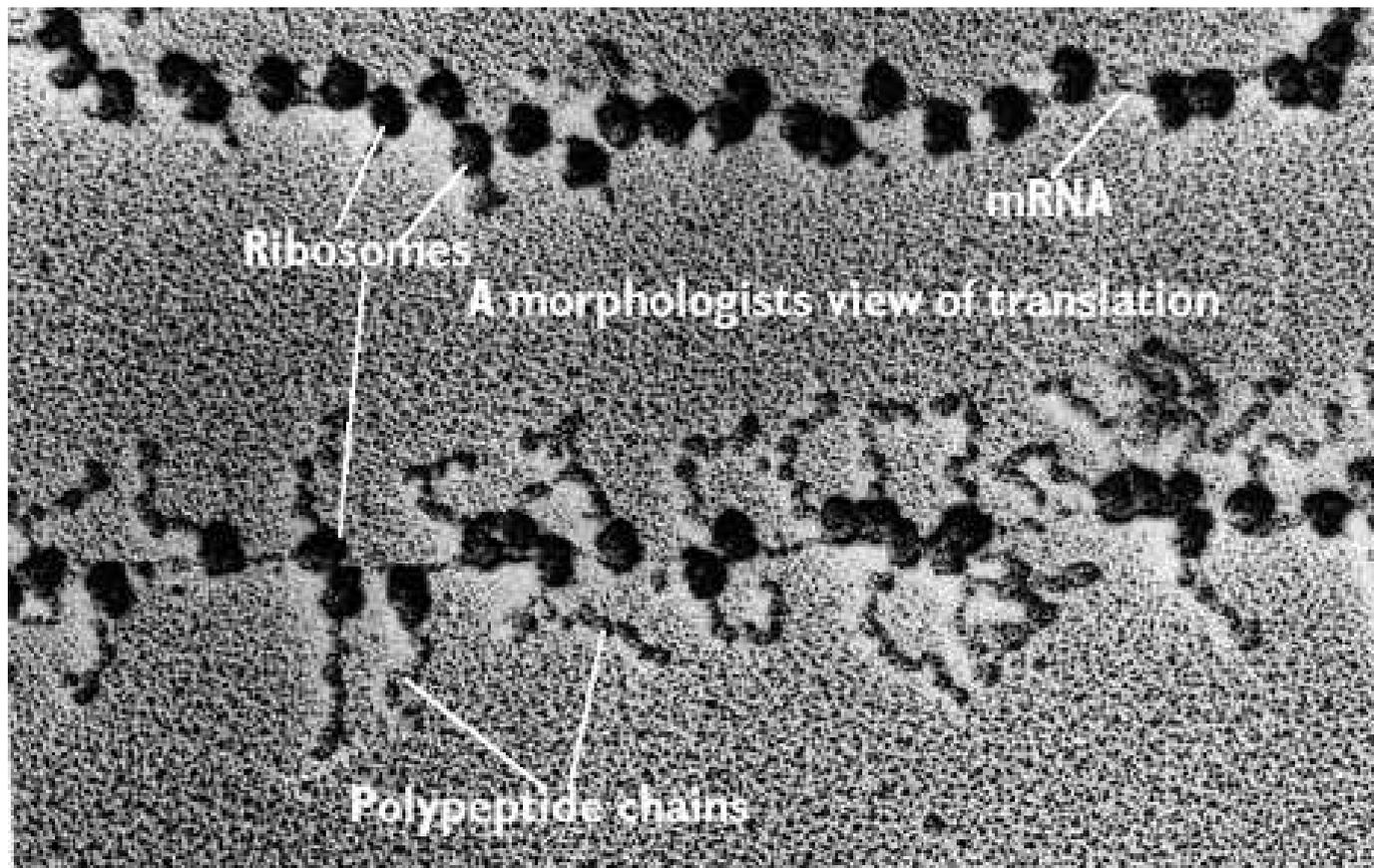


URL Address: <http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/ribosome.htm>

Gwen V. Childs, Ph.D.



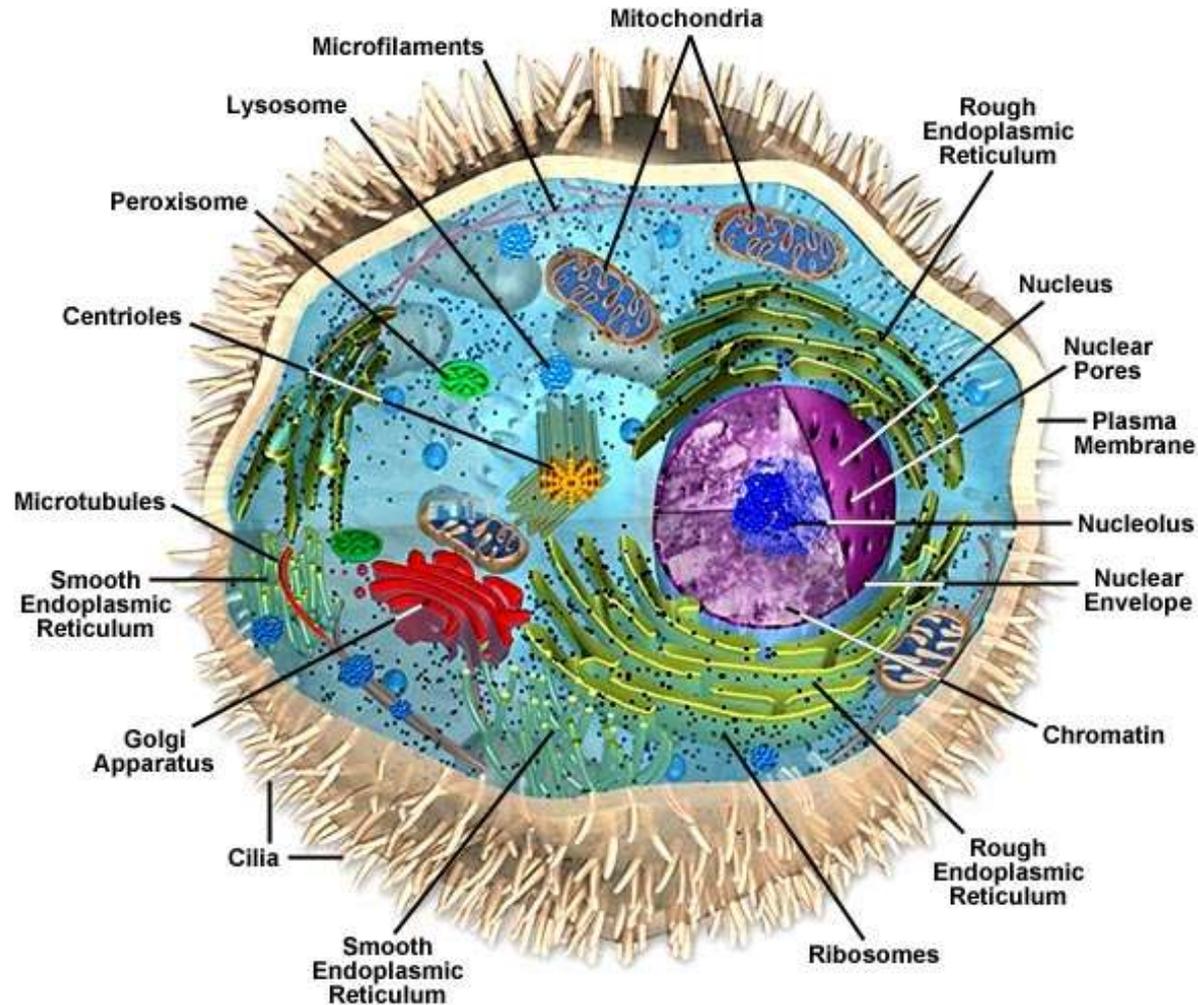
На одной молекуле мРНК множество рибосом могут одновременно вести синтез белковых цепей. Такие скопления рибосом называются полирибосомами.





Общая схема строения клетки.

Для множества органелл с разными функциями требуется синтез разных белков и их адресное распределение.





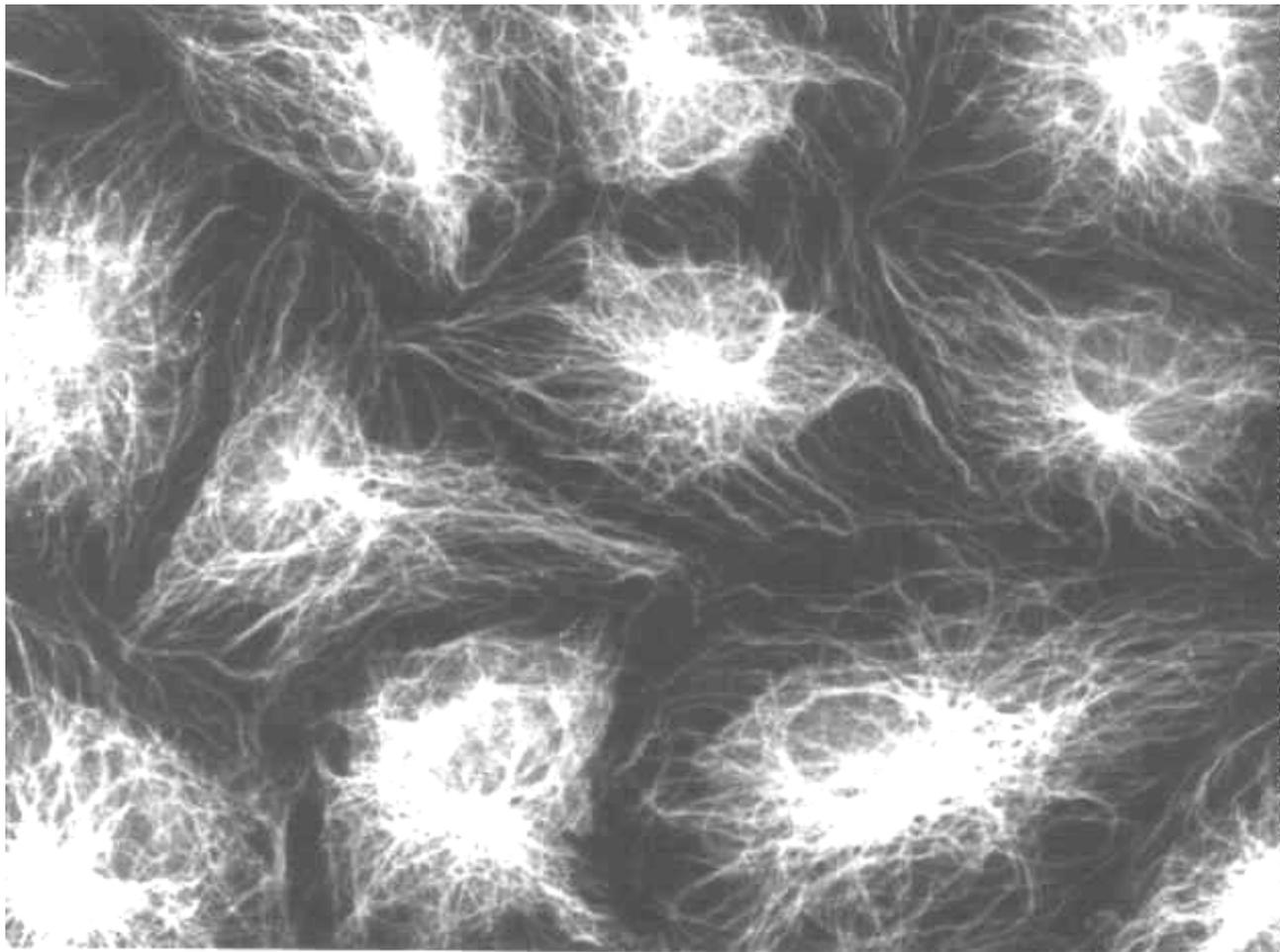
«... по "жизненным условиям", по стабилизирующим структуру белков взаимодействиям и общему типу строения белки можно разбить на три класса: (1) фибриллярные белки; (2) мембранные белки; и (3) водорастворимые глобулярные белки.»

Из:

ВВЕДЕНИЕ В ФИЗИКУ БЕЛКА
КУРС ЛЕКЦИЙ
1999-2000 гг.

Алексей Витальевич Финкельштейн

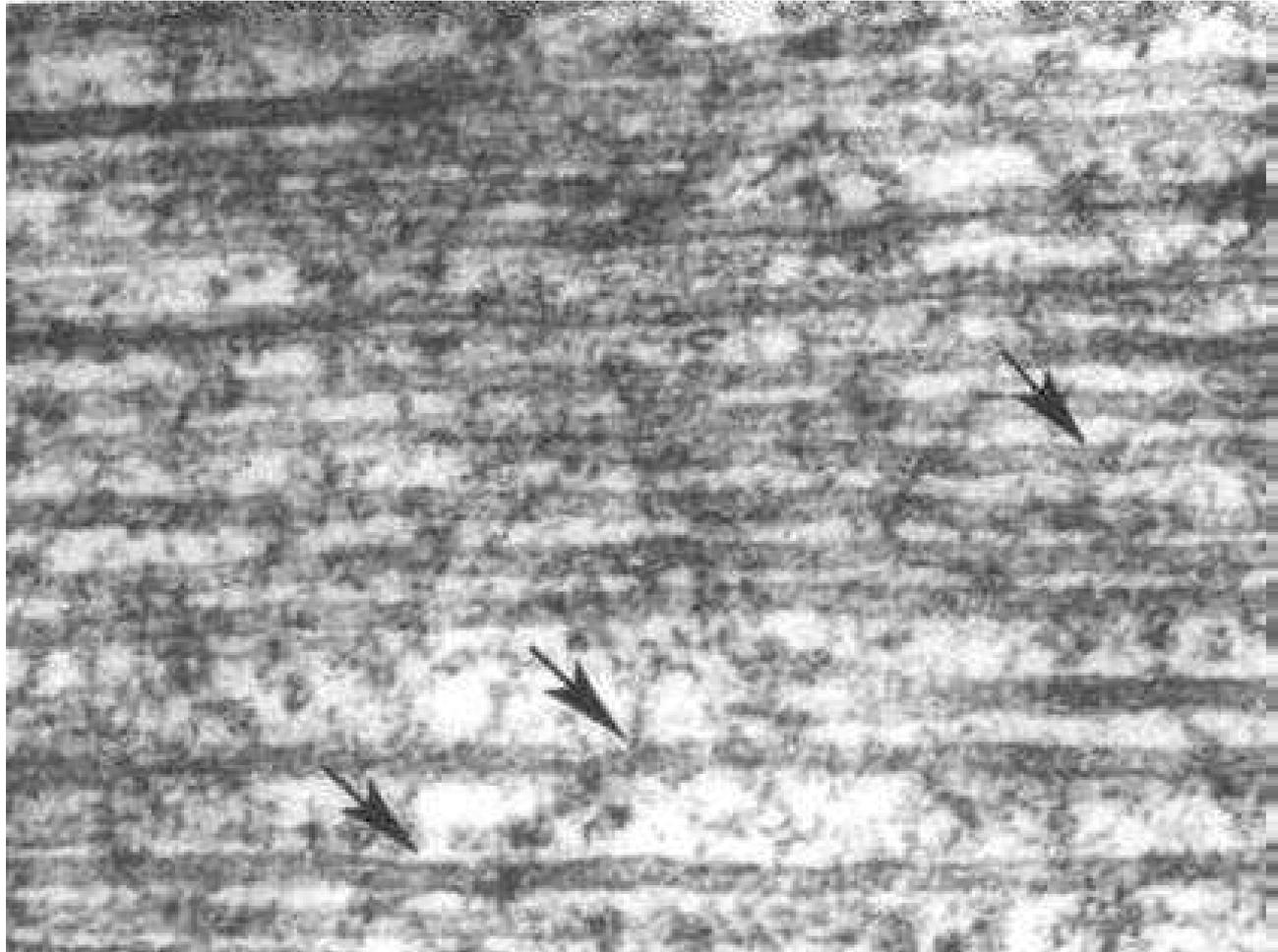
http://phys.protres.ru/lectures/protein_physics/111.html



Распределение микротрубочек (основной компонент цитоскелета) в клетках, выращенных в культуре. В световой микроскоп видны флуоресцирующие антитела, наработанные против тубулина – белка, из которого состоят микротрубочки.



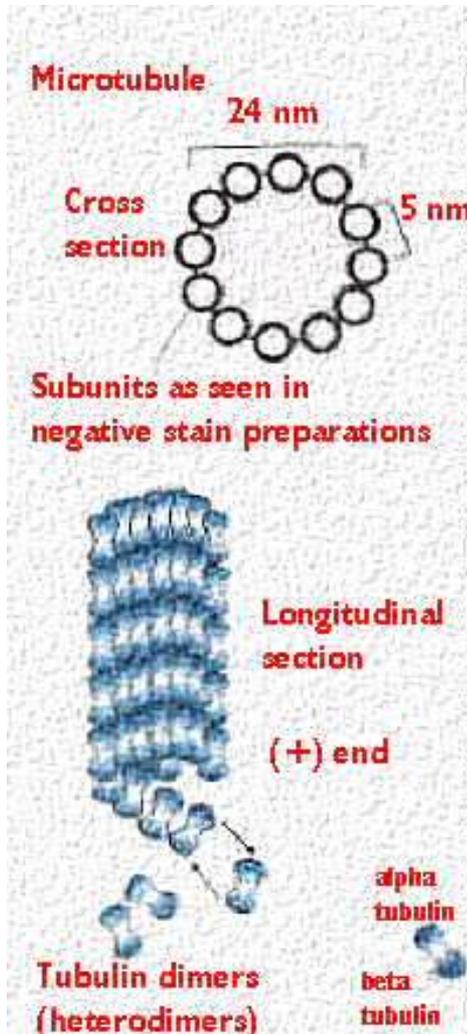
Электронная микрофотография микротрубочек.



http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/microtubule_structure.htm



Формирование микротрубочки:



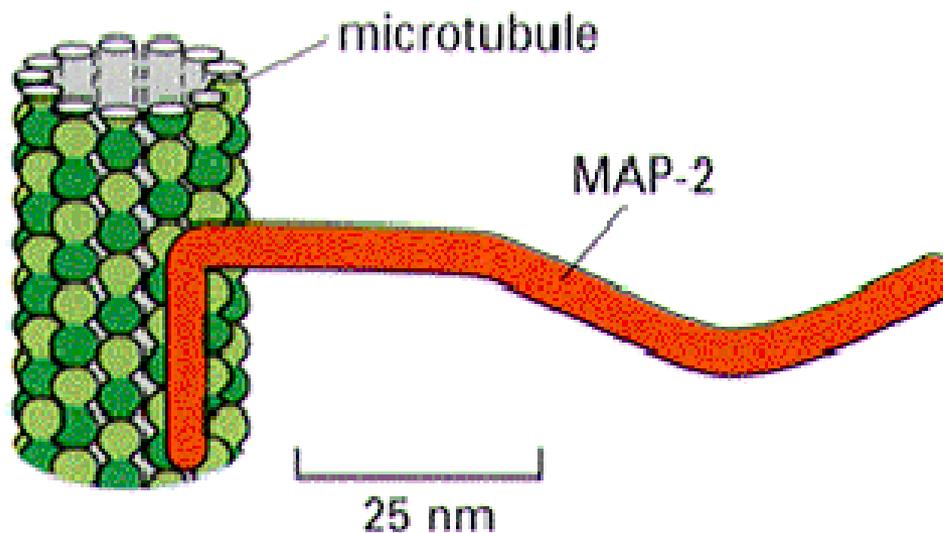
Стадия нуклеации (медленная);
Стадия элонгации (сравнительно быстрая).

Динамическая нестабильность:

Период полураспада тубулина – около 15 час.
Скорость синтеза и распада микротрубочек может варьировать в зависимости от функционального состояния клетки, так что время полужизни микротрубочки в среднем составляет около 10 минут.



С микротрубочками ассоциированы белки (**Microtubule Associated Proteins – MAPs**). Один домен такого белка соединяется с тубулином (или с тубулиновым полимером), другой, внешний, может связываться с гранулами, мембранными пузырьками, другими микротрубочками, или другими компонентами цитоскелета.

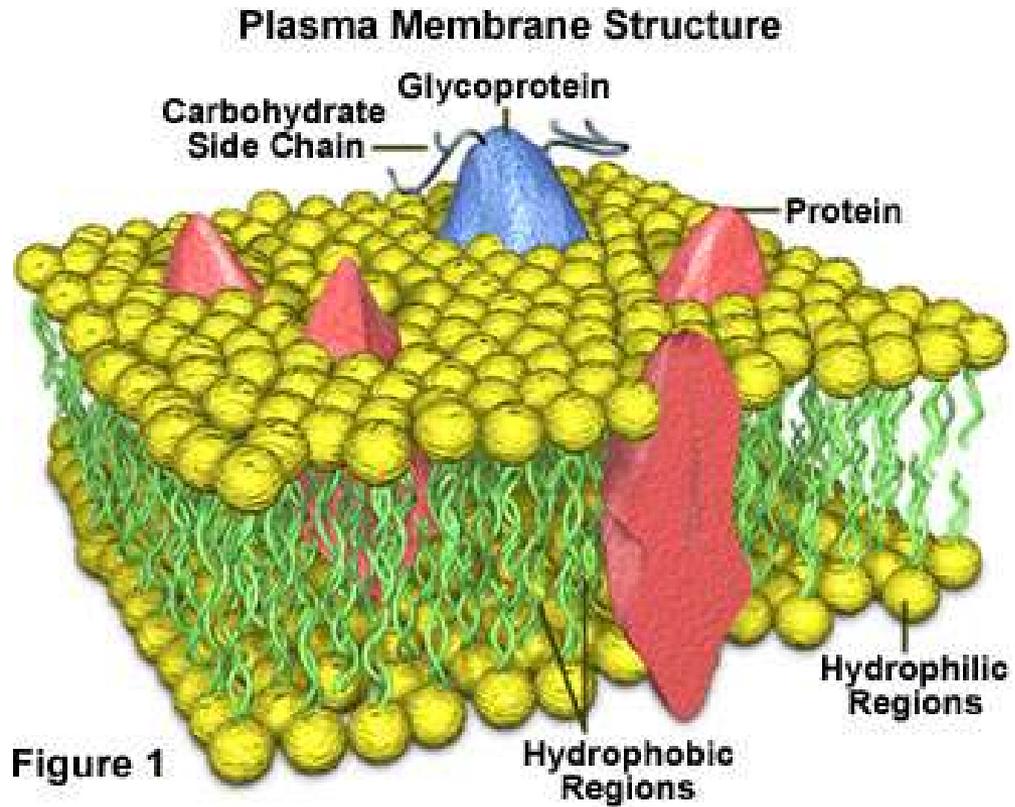


[B]

http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/microtubule_structure.htm

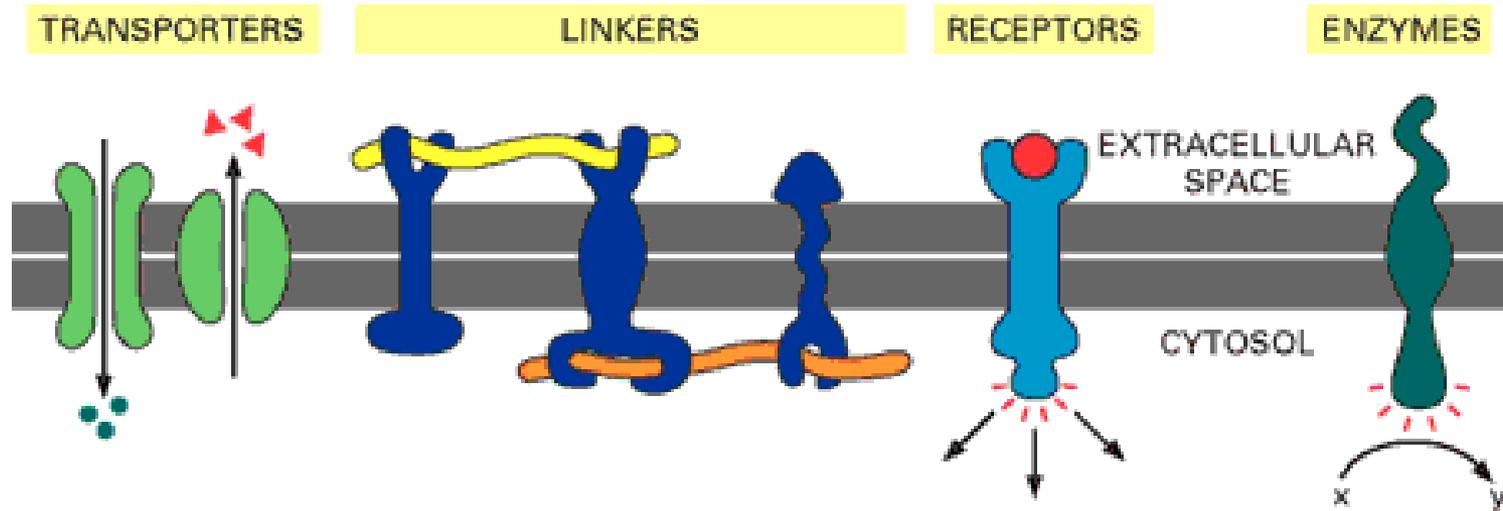


Структура плазматической мембраны.





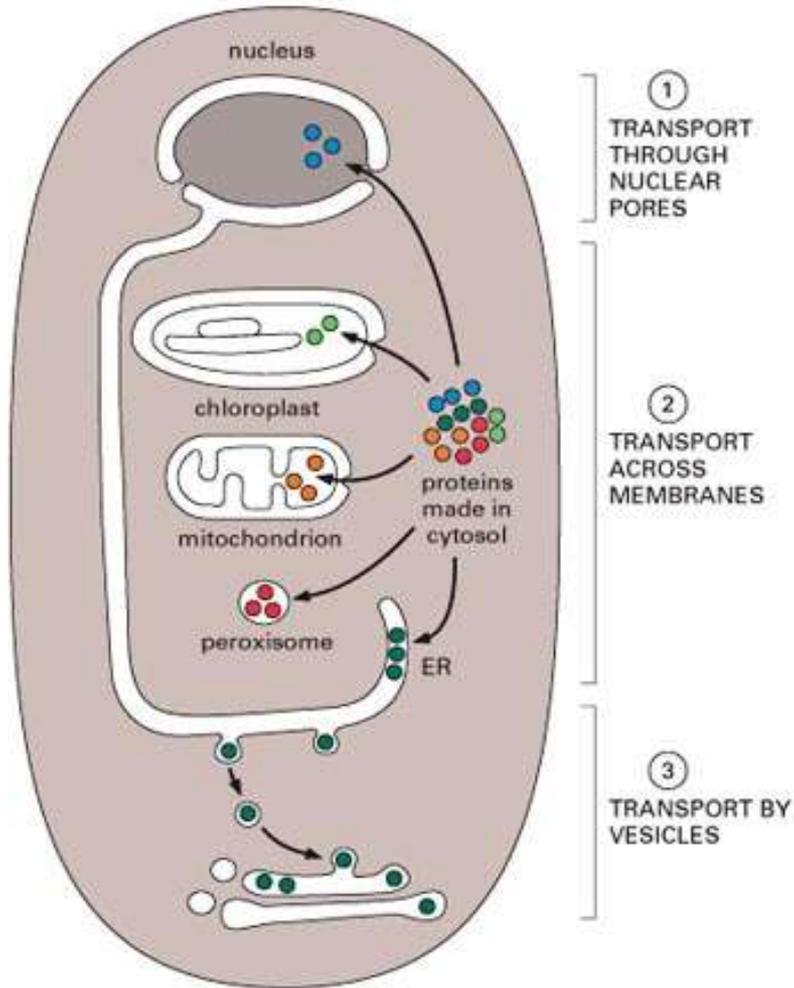
Некоторые примеры функций белков плазматической мембраны



<http://www.accessexcellence.org/AB/GG/pMembranes.html>



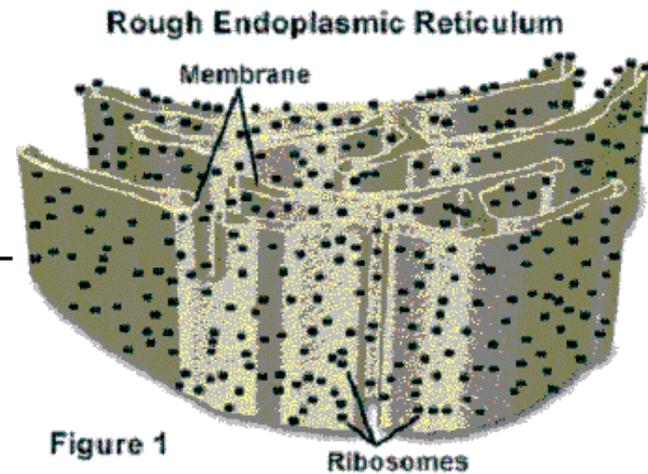
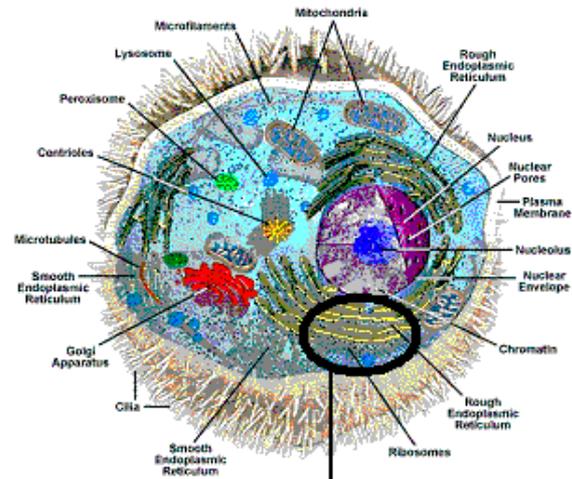
Топология клеточного пространства.



Основные проблемы при распределении белков возникают при пересечении мембран.



Эндоплазматический ретикулум



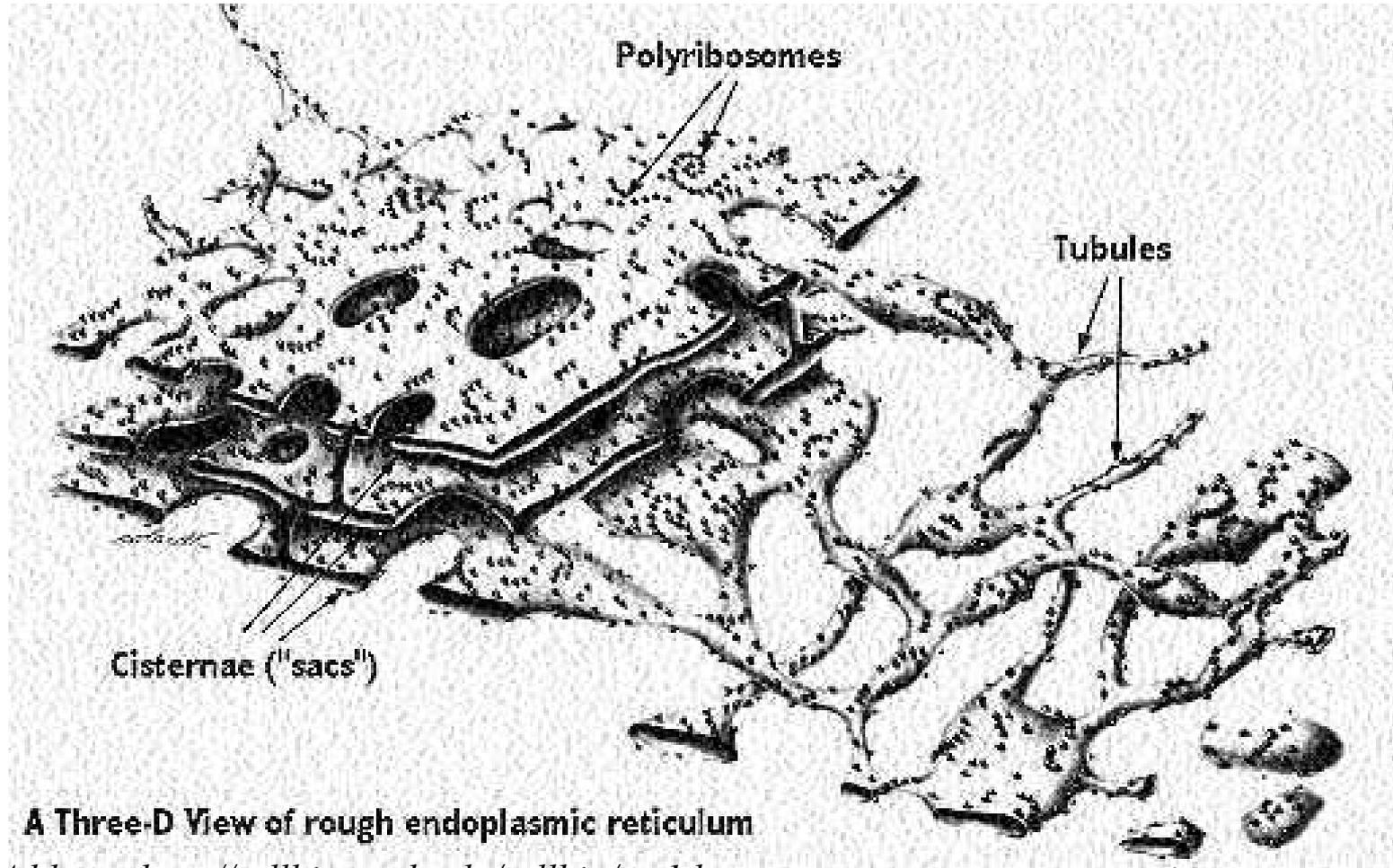
Адаптировано из:
URL Address: <http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/ribosome.htm>
Gwen V. Childs, Ph.D.

Figure 1

Ribosomes



Реконструкция шероховатого эндоплазматического ретикула.



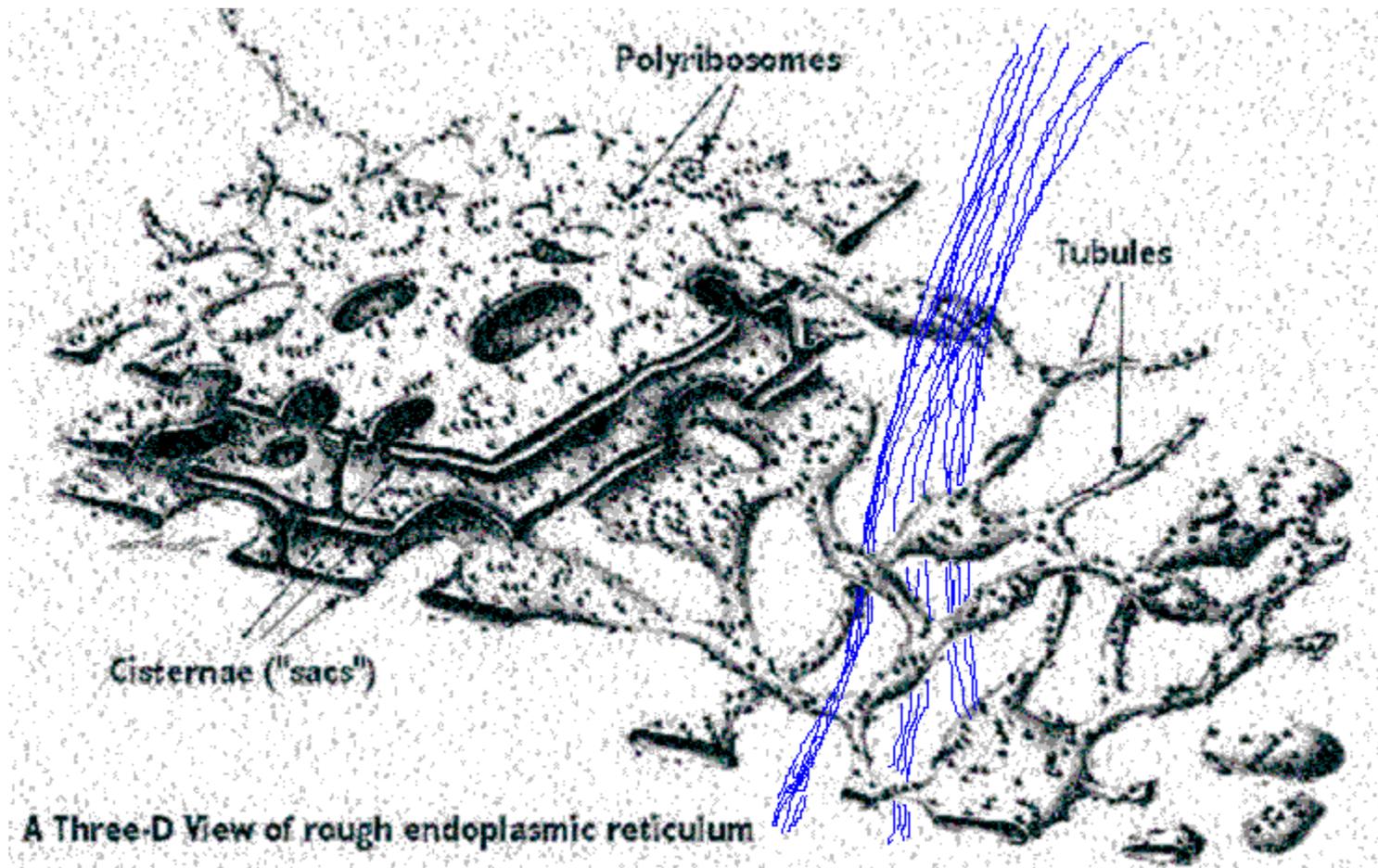
A Three-D View of rough endoplasmic reticulum

URL Address: <http://cellbio.utmb.edu/cellbio/rer1.htm>

Gwen V. Childs, Ph.D

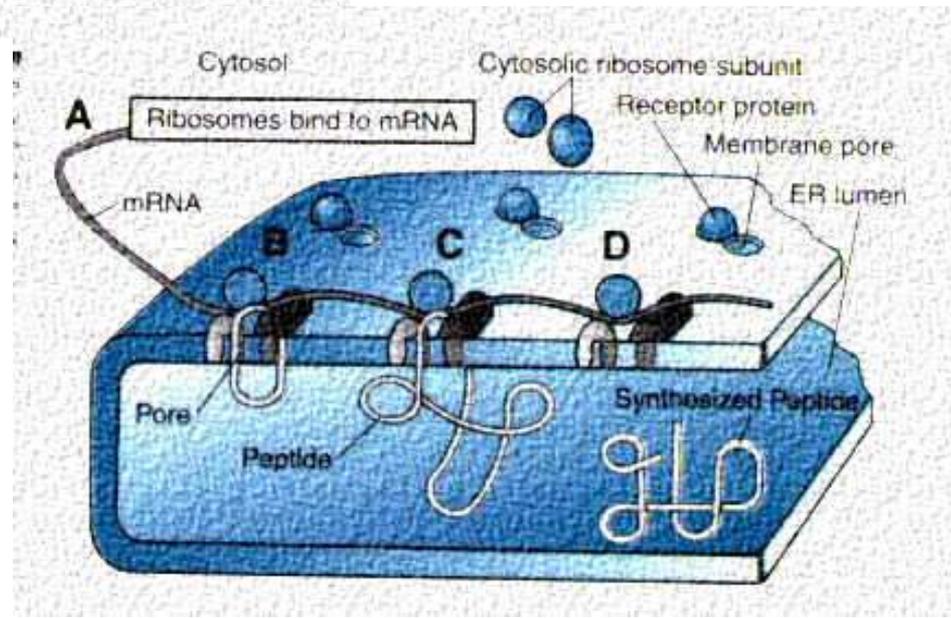
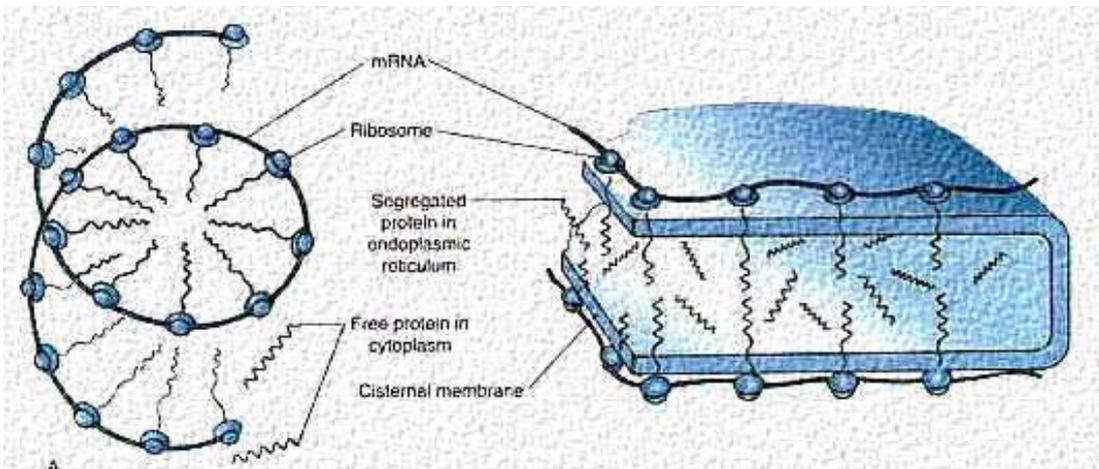


Микротрубочки цитоскелета не пересекают мембран эндоплазматического ретикулума.





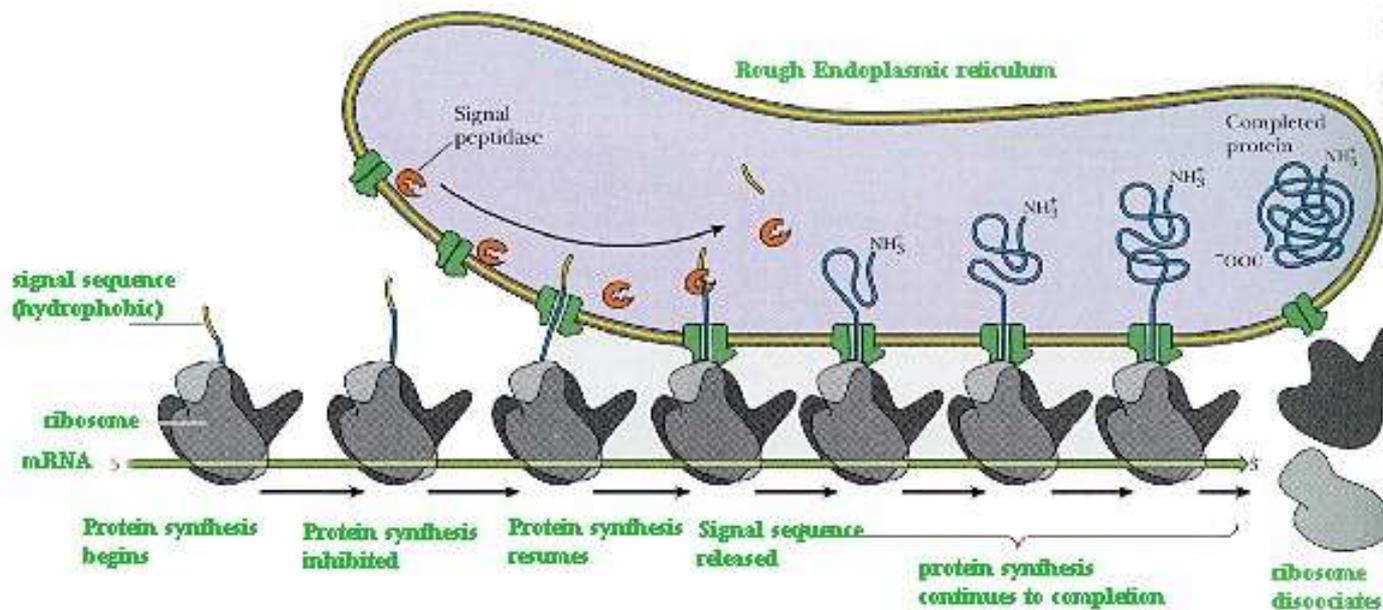
Белки, которые должны покинуть цитоплазматический компартмент, синтезируются на шероховатом ретикулуме и сразу транспортируются в просвет ЦР.



URL Address: <http://cellbio.utmb.edu/cellbio/rer1.htm>
Gwen V. Childs, Ph.D



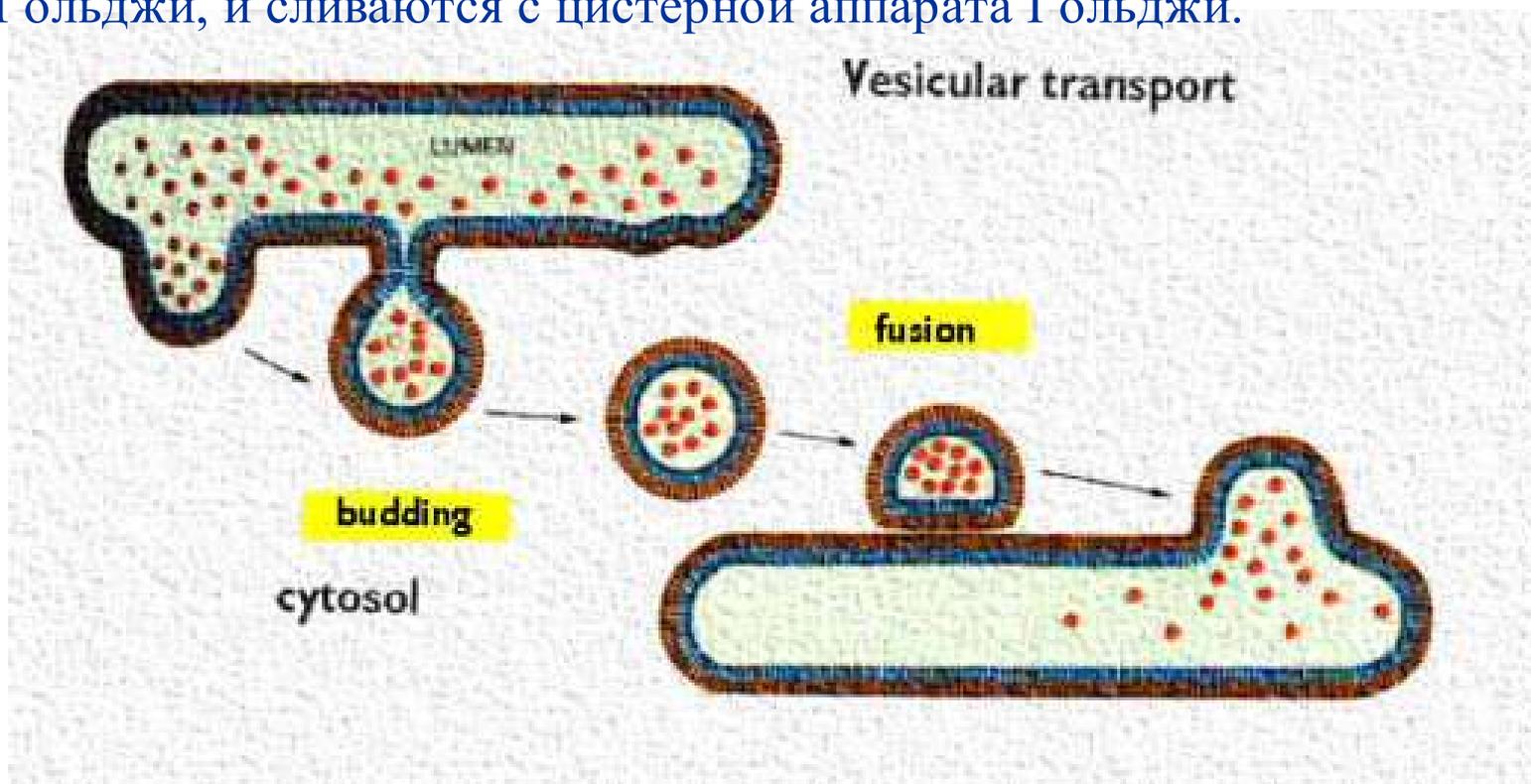
Это обеспечивается наличием на N-конце синтезируемой цепи участка, называемого сигнальным пептидом. В мембране ЦР находится фермент – сигнальная пептидаза, который отрезает сигнальный пептид от белковой цепи.



URL Address: <http://cellbio.utmb.edu/cellbio/rer2.htm>
Gwen V. Childs, Ph.D.



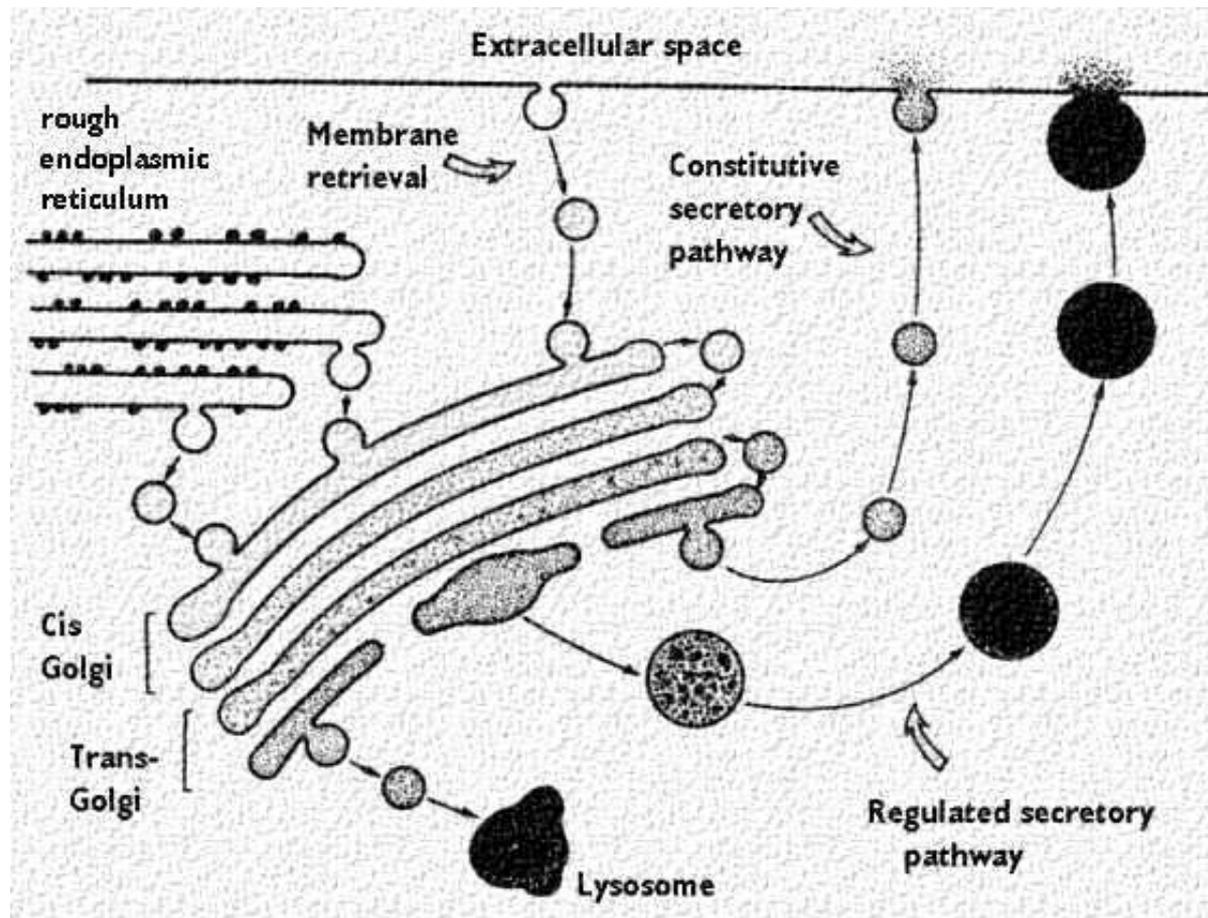
От шероховатого ЭР «отшнуровываются» пузырьки с нужными белками, которые переносятся к специальной мембранной системе – аппарату Гольджи, и сливаются с цистерной аппарата Гольджи.



<http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/golgi.htm>

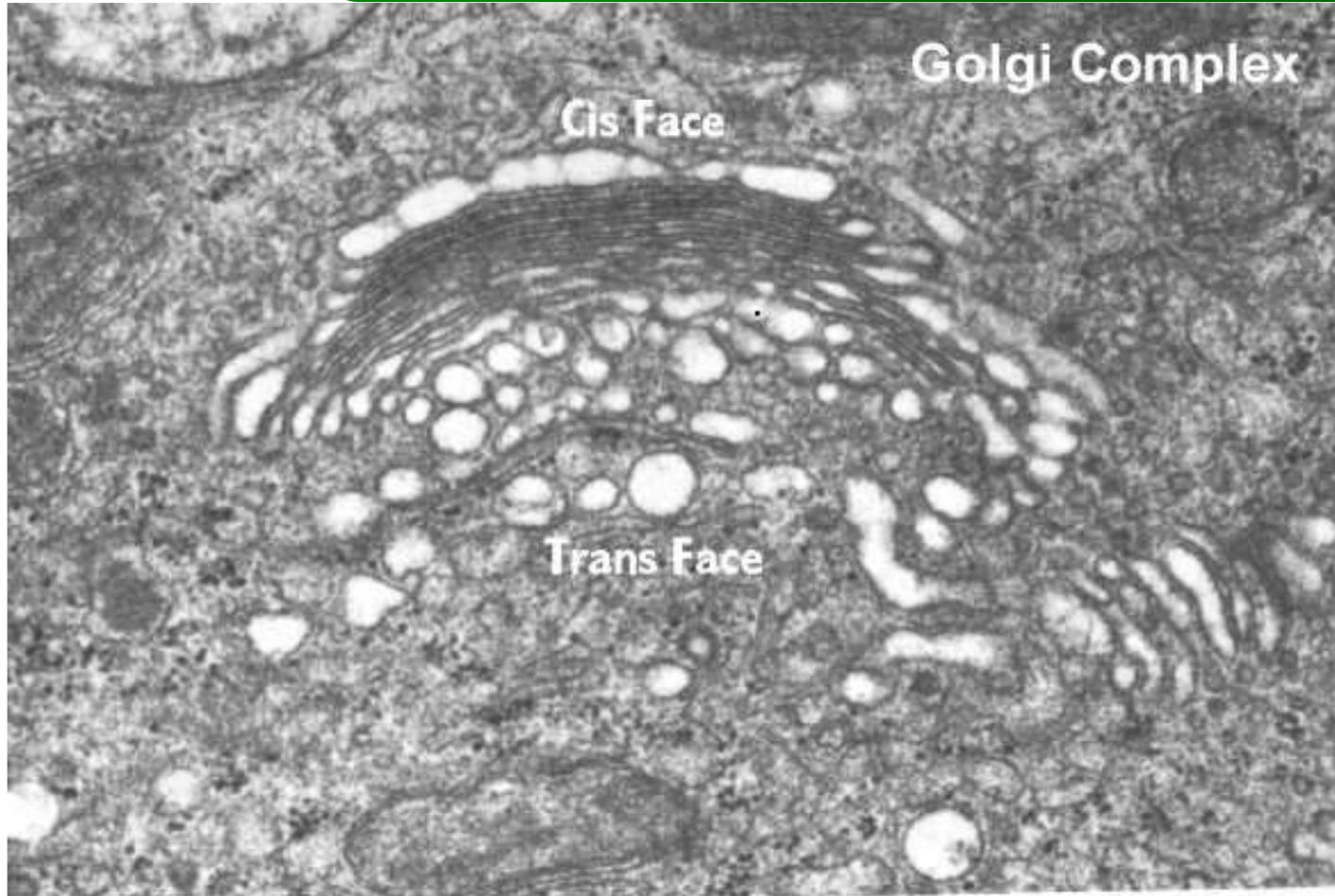


Аппарат Гольджи выносит свое содержимое на поверхность клетки. Кроме этого аппарат Гольджи участвует в переносе молекул с клеточной поверхности к лизосомам – органеллам, содержащим ферменты для гидролиза этих молекул.





Электронная микрофотография комплекса Гольджи.



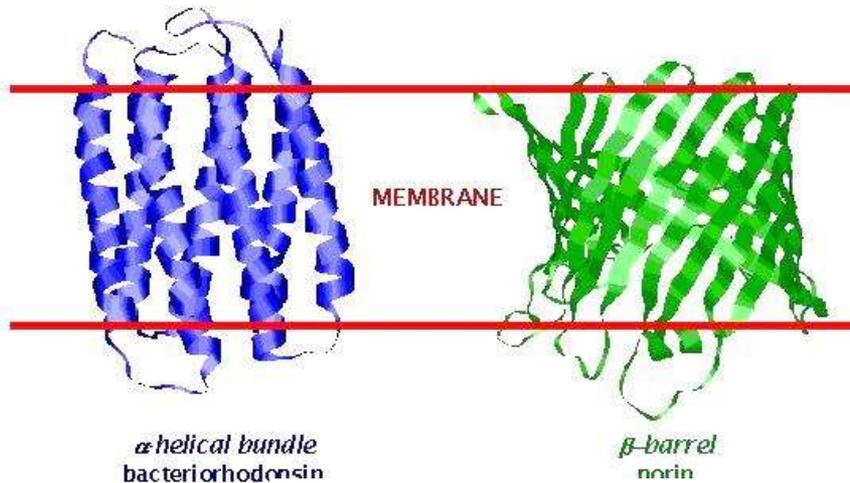
<http://www.cytochemistry.net/organelles/review1.htm>



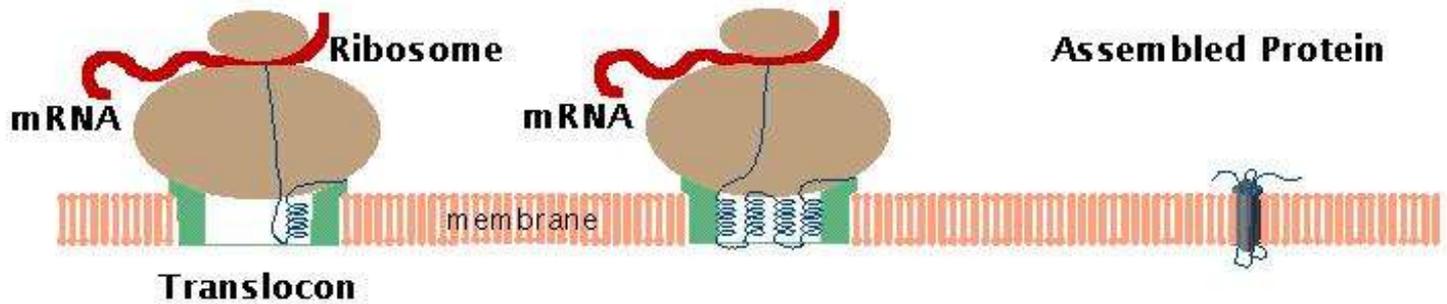
Мембранные белки



Membrane Proteins: The Two Known Structural Classes



Constitutive Membrane Protein Assembly



Based on Borel and Simon (1996) *Cell* 85:379 and Do et al. (1996) *Cell* 85:369. Illustration by S. White



Все белки, являясь нежесткими молекулами, в процессе функционирования или тепловых флуктуаций в конце концов теряют нативную структуру, т.е. структуру, необходимую для их правильного функционирования. Такие денатурированные белки необходимо убрать из клетки.

Кроме того, существует класс регуляторных белков, которые синтезируются в определенное время, выполняют регуляцию, и должны быстро исчезнуть.

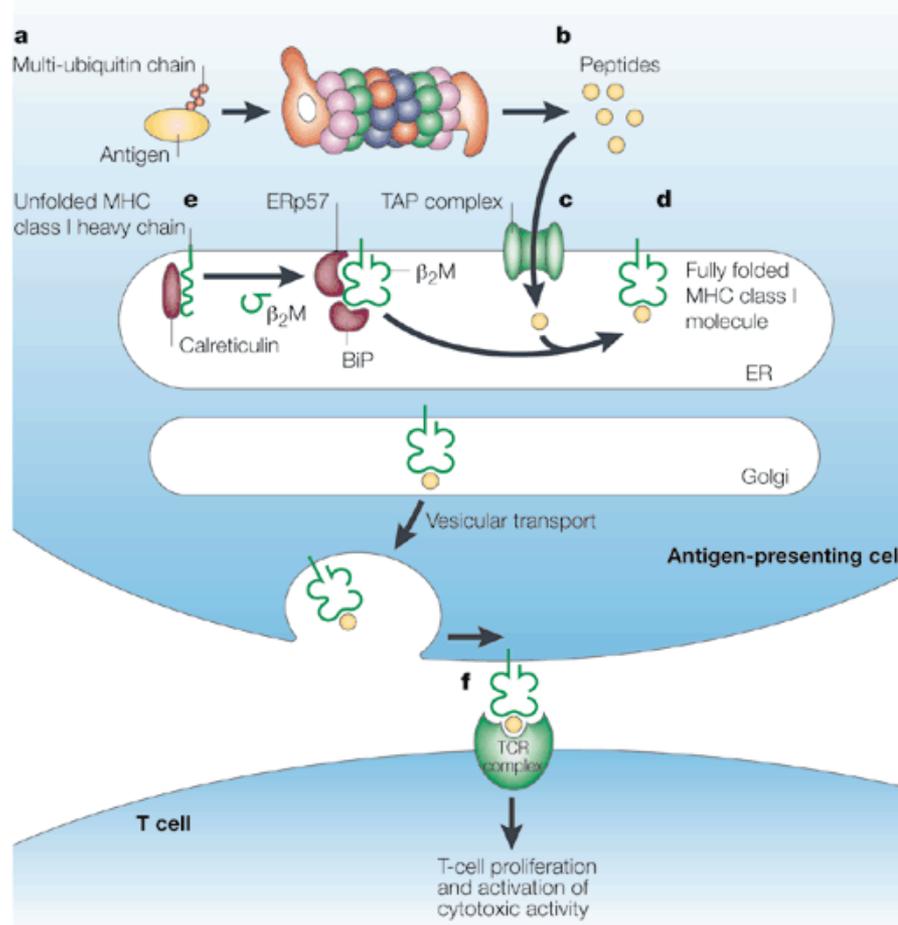
Процесс деградации белков идет разными путями для разных классов белков.

Основной путь деградации белков, находящихся в цитоплазматическом компартменте – деградация протеасомами и разнообразными протеазами и пептидазами .

Белки, находящиеся в мембране или на поверхности клетки, аппаратом Гольджи переносятся к лизосомам и разрушаются в них.



Протеасомальный путь деградации белков



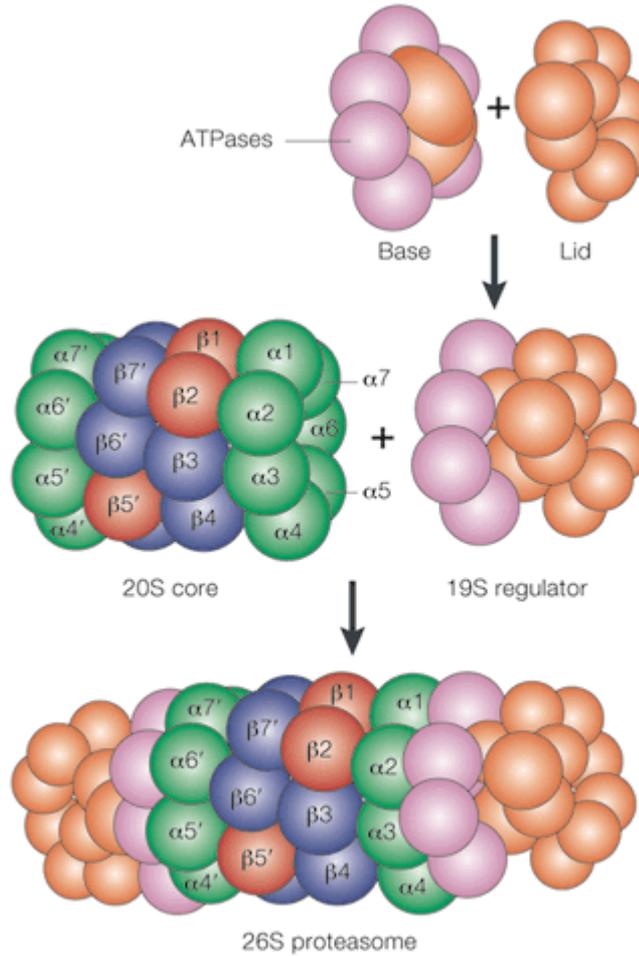
Nature Reviews | Molecular Cell Biology



Протеасомальный путь деградации белков



Модель протеасомы



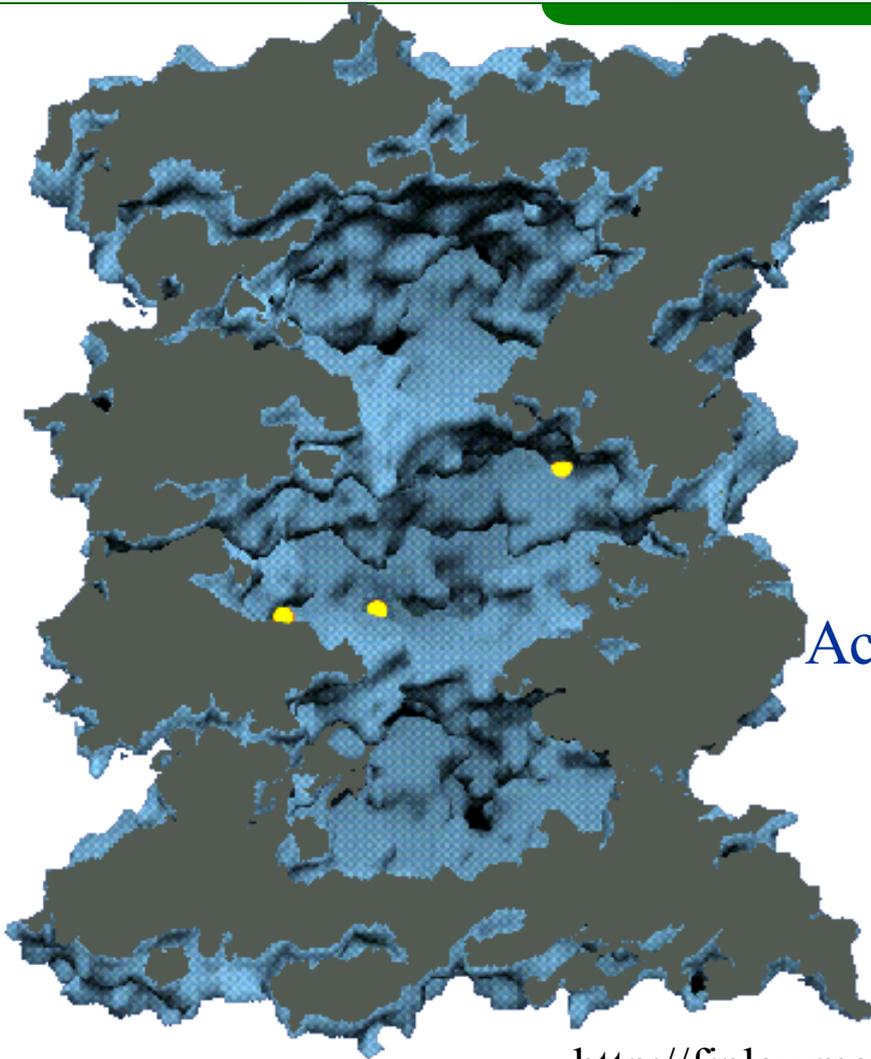
Nature Reviews | Molecular Cell Biology



Протеасомальный путь деградации белков



Yeast 20S Proteasome Side View

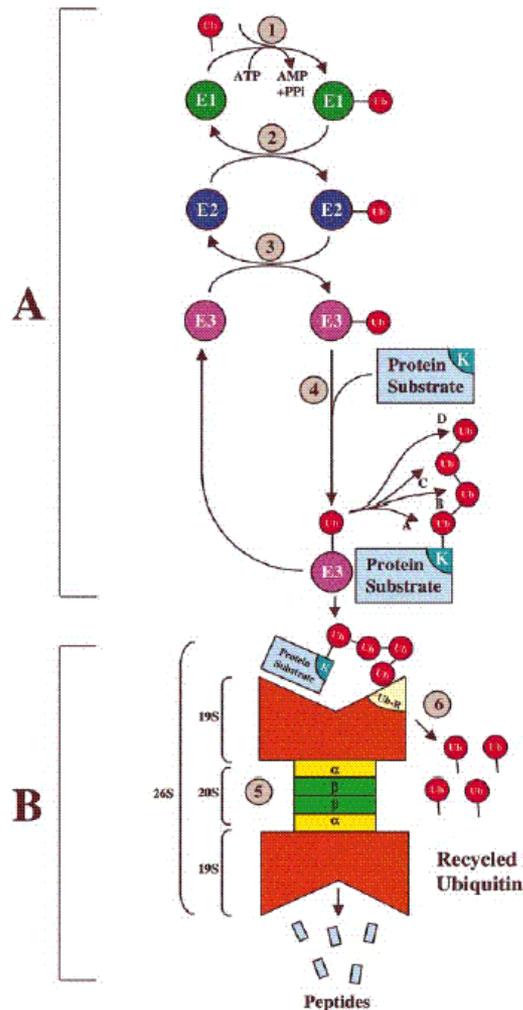


Active sites are indicated as yellow dots

<http://finley.med.harvard.edu/ubiquitin/Structures/y20s.html>



Протеасомальный путь деградации белков

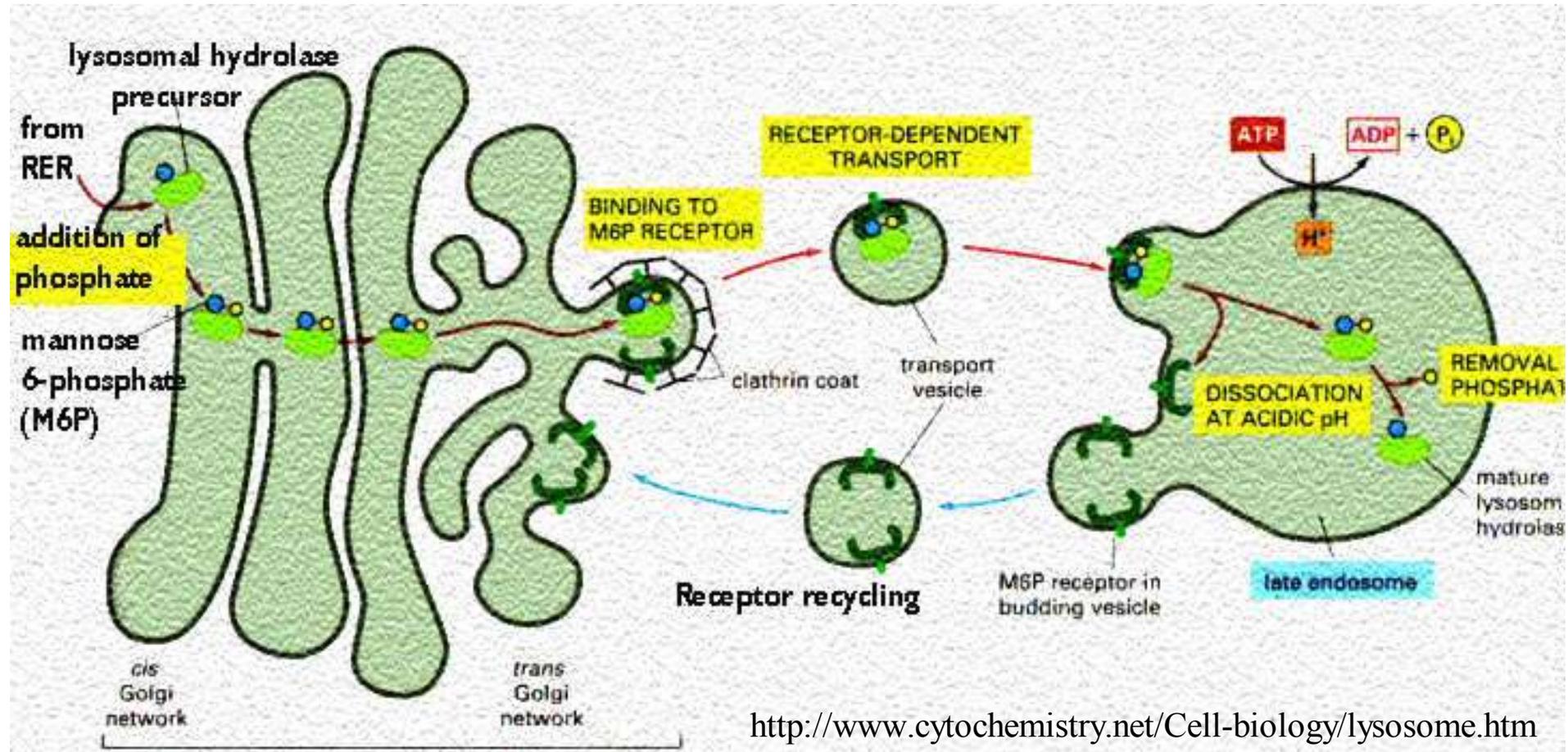


Убиквитин – зависимая протеасомная деградация белков



Лизосомальный путь деградации белков.

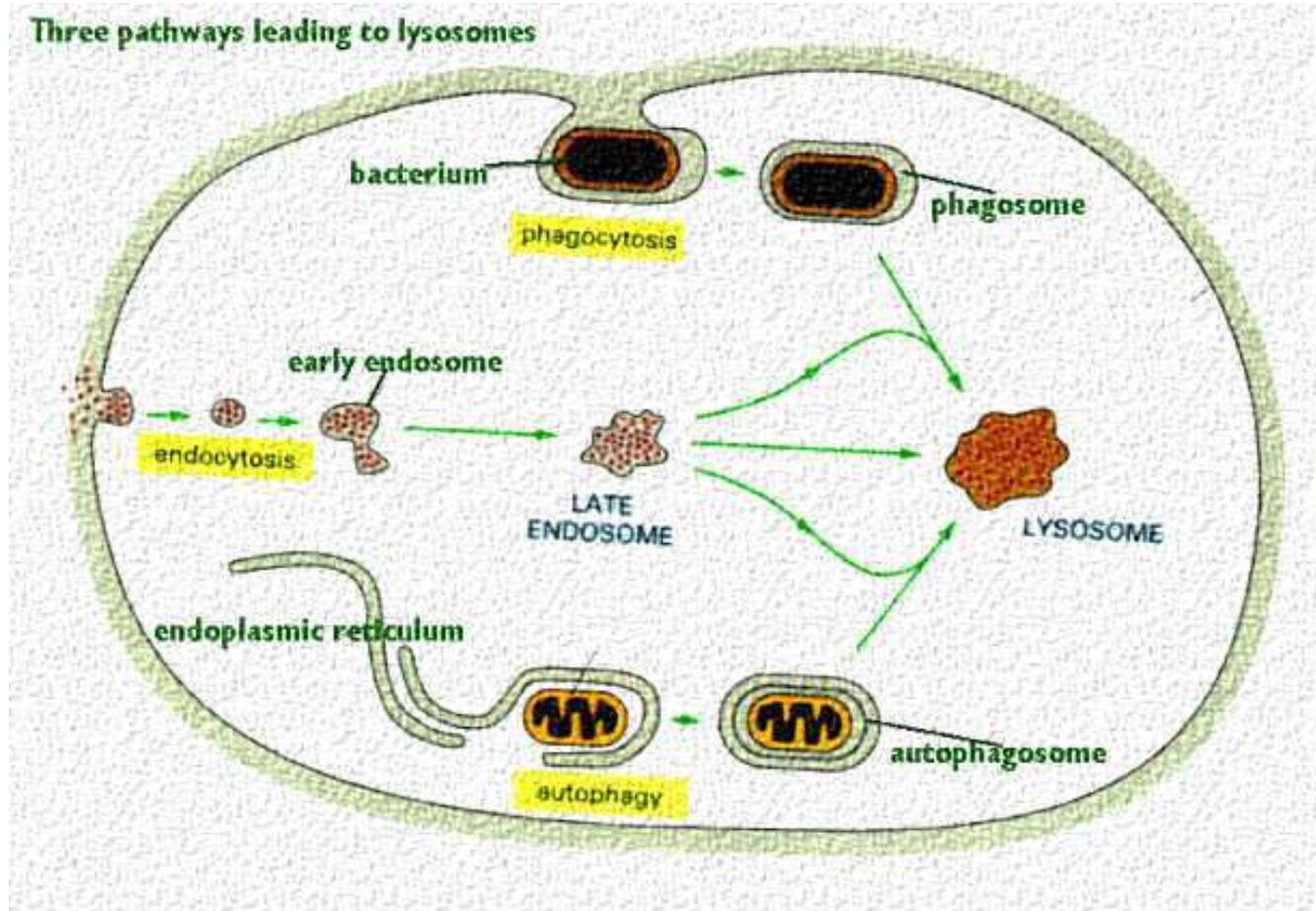
Аппарат Гольджи сортирует лизосомальные ферменты, полученные из шероховатого ЭР и транспортирует их в лизосому



<http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/lysosome.htm>



Лизосомы принимают участие в фагоцитозе, эндоцитозе и аутофагии.



<http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/lysosome.htm>



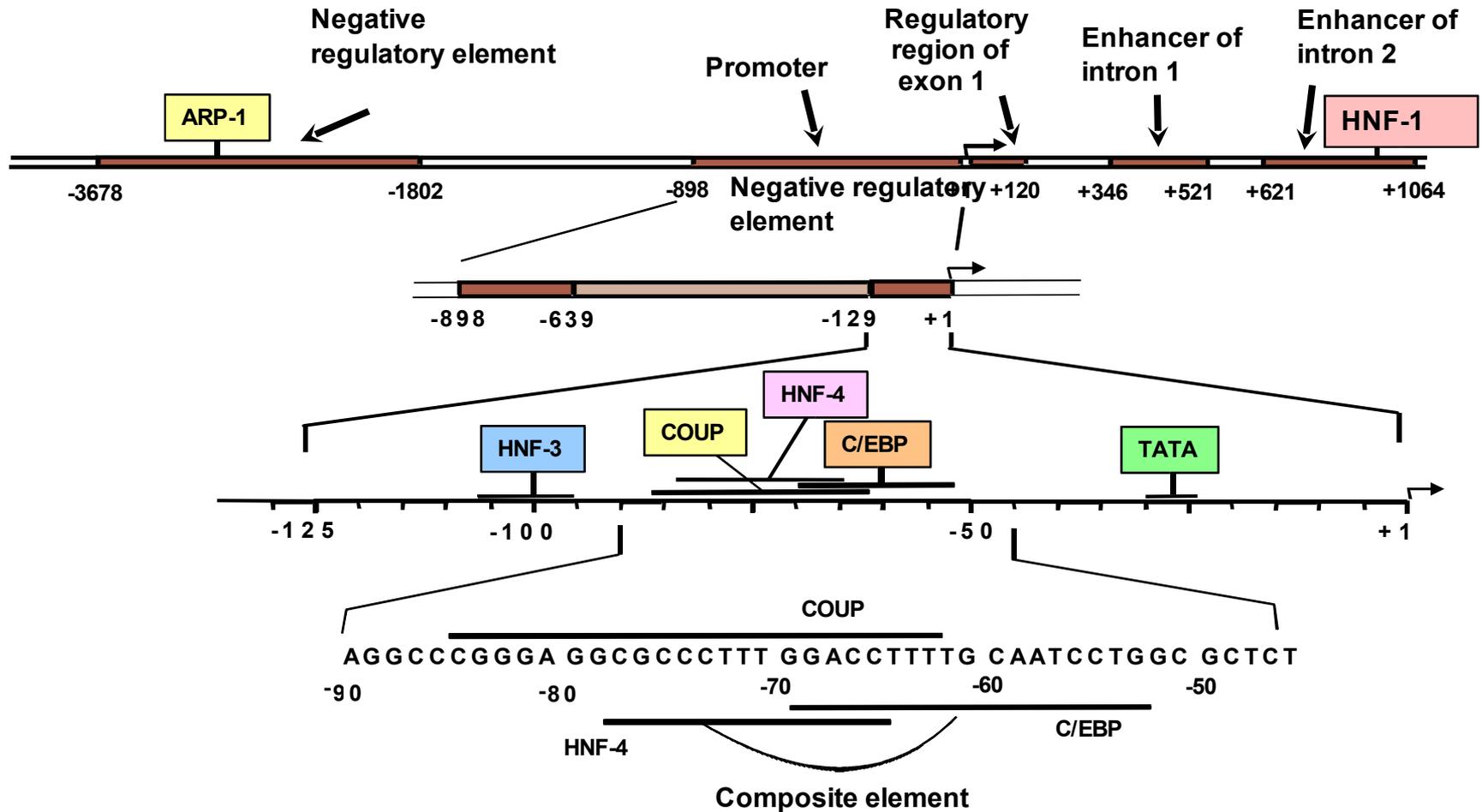
В виду такого огромного разнообразия белков сложной сети их взаимодействий , регуляция обмена белков является сложным процессом. Изучение этого процесса требует привлечения сложных методов обработки информации и методов моделирования, развиваемых в **биоинформатике**.

Регуляция обмена белков происходит

- на стадии транскрипции;
- на стадии трансляции;
- на стадии распределения по месту назначения;
- на стадии деградации.

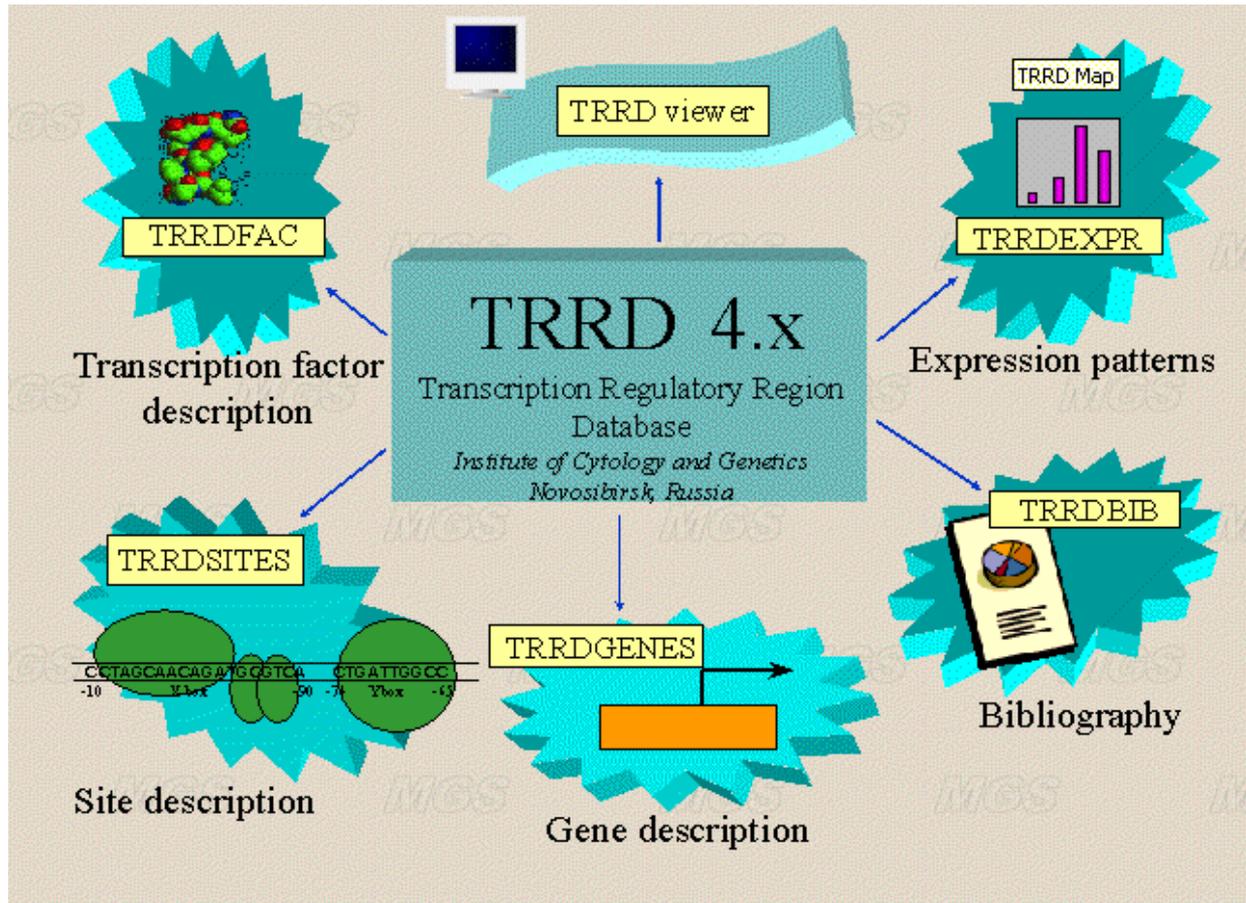


Organization of regulatory regions controlling transcription of human apolipoprotein B gene





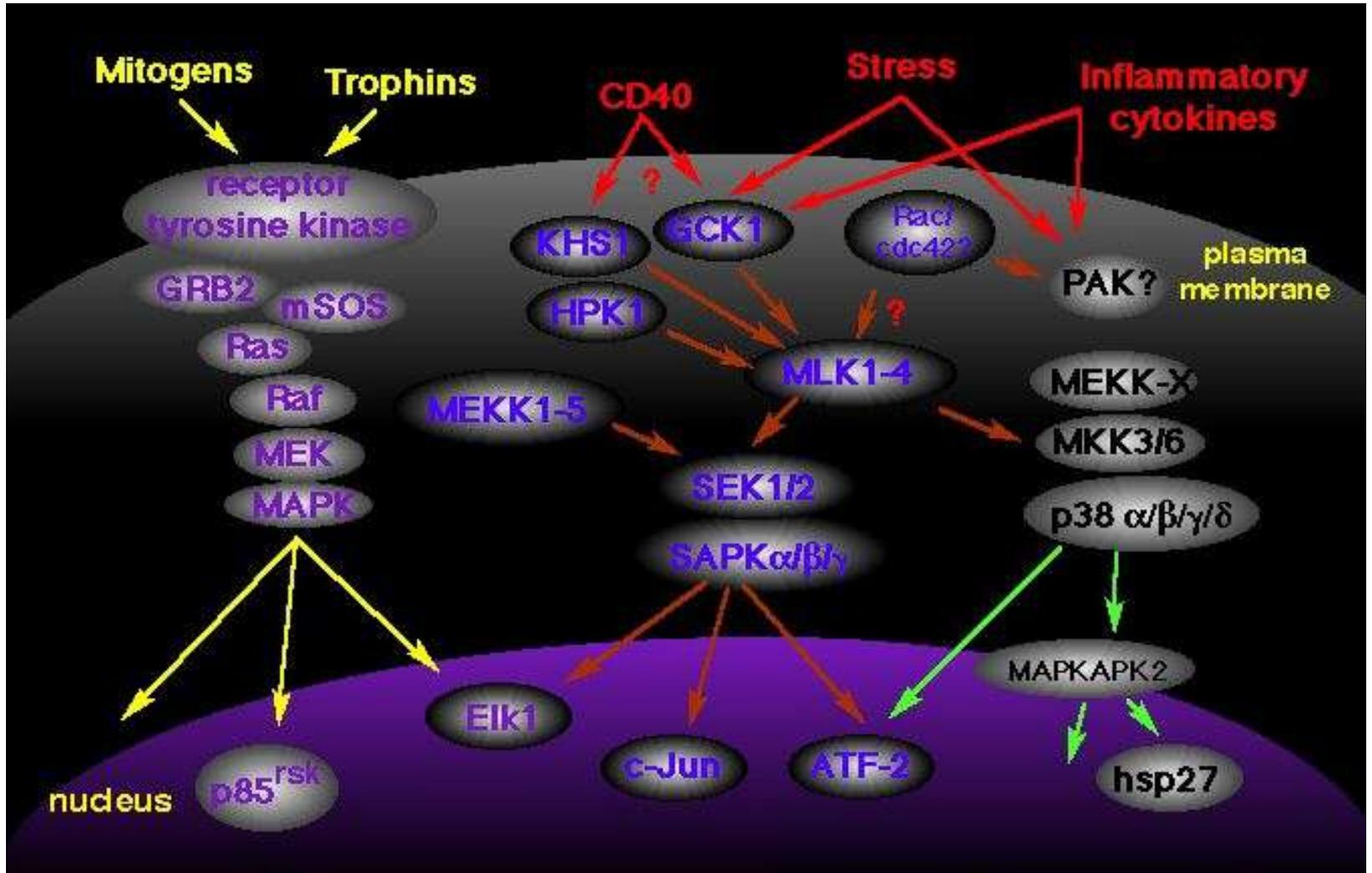
Регуляция транскрипции.



Задачи распознавания регуляторных районов в генах и создания базы данных по таким районам.



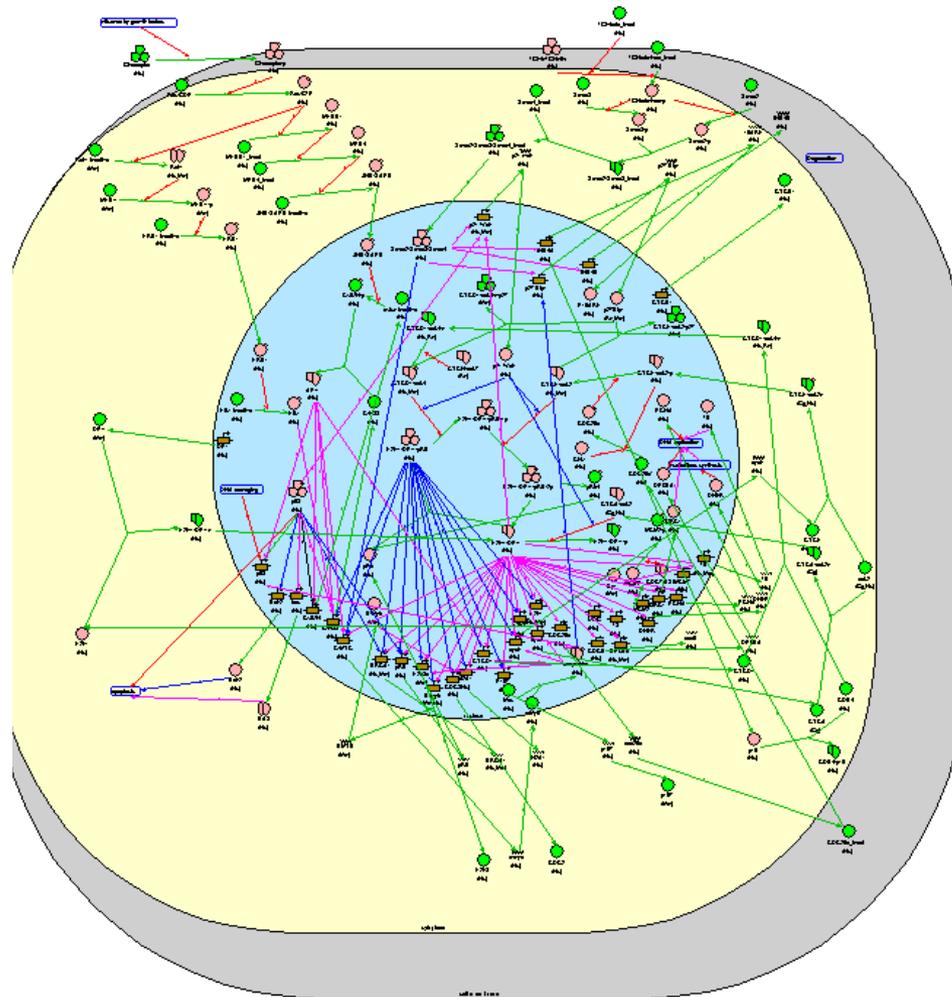
Пример регуляции транскрипции митогенами (Mammalian MAPK signalling pathways)



<http://kinase.oci.utoronto.ca/signallingmap.html>

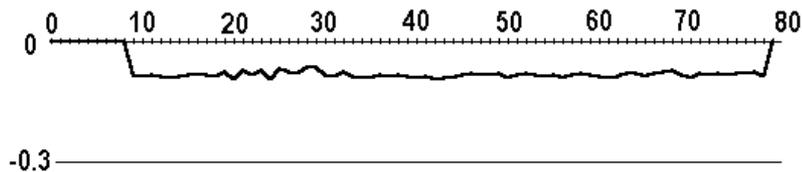
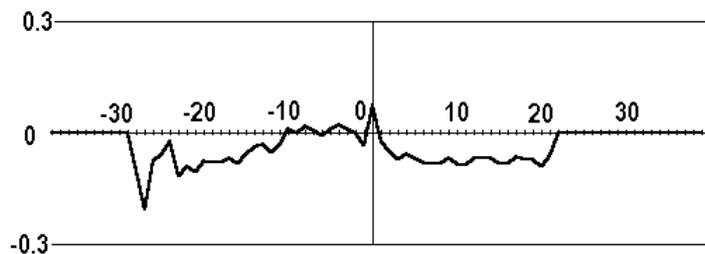


Пример цепи регуляции клеточного цикла в Gene Express





Регуляция распределения белков по клеточным компартментам осуществляется наличием различных сигнальных пептидов на молекулах белка. Распознавание сигнальных пептидов позволяет по первичной последовательности предсказывать функции белков и их места локализации. Другой важной задачей является распознавание трансмембранных районов в белковой молекуле.



Пример распознавания сайта разрезания на фрагменте, содержащем сигнальный пептид (слева) и в случае отсутствия сигнального пептида (справа).

(Распознавание наличия и места локализации сайта разрезания протеинов. Загоруйко Н.Г., Иванисенко В.А., Николаев С.В., Кутненко О.А. *Институт Математики СО РАН, Институт Цитологии и Генетики СО РАН*)



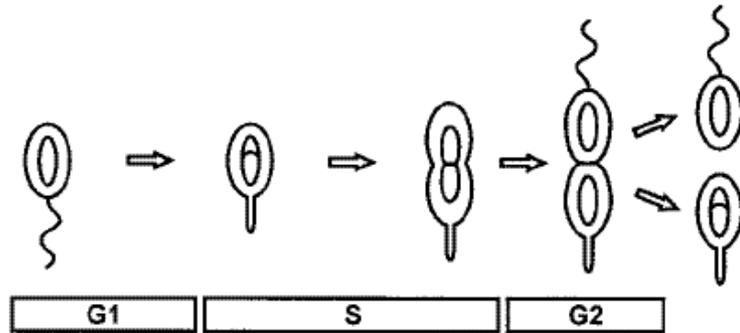
В регуляции деградации белков важную роль играет полиубиквитинизация белков. К настоящему времени выявлена лишь небольшая часть мотивов, характерных для сайтов, распознаваемых ферментом убиквитин-лигазой – ферментом, обеспечивающим ковалентную «пришивку» убиквитина к белковой цепи.



Различные функциональные состояния клетки характеризуются разным белковым составом.



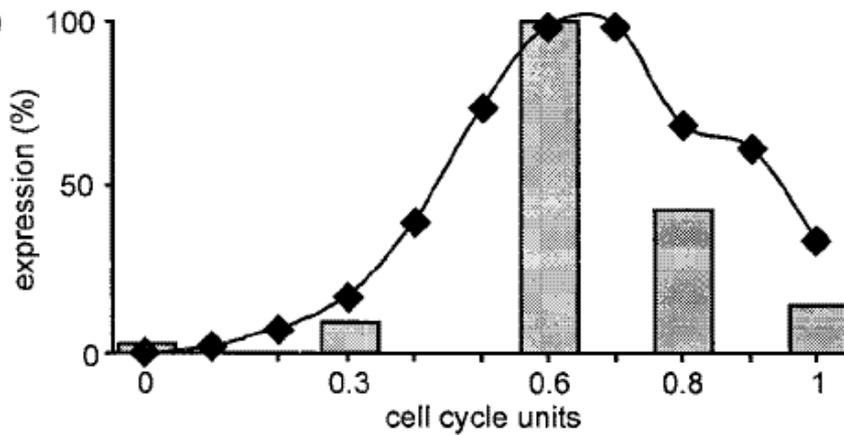
A)



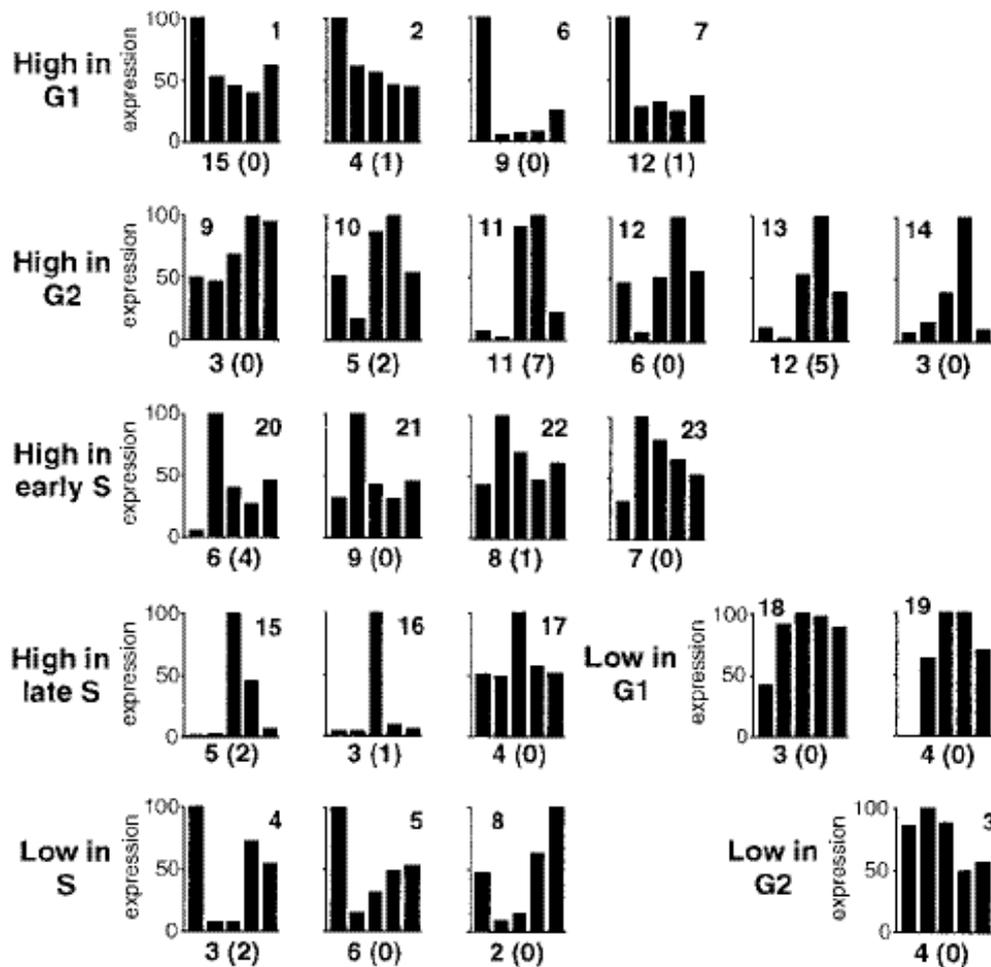
B)



C)



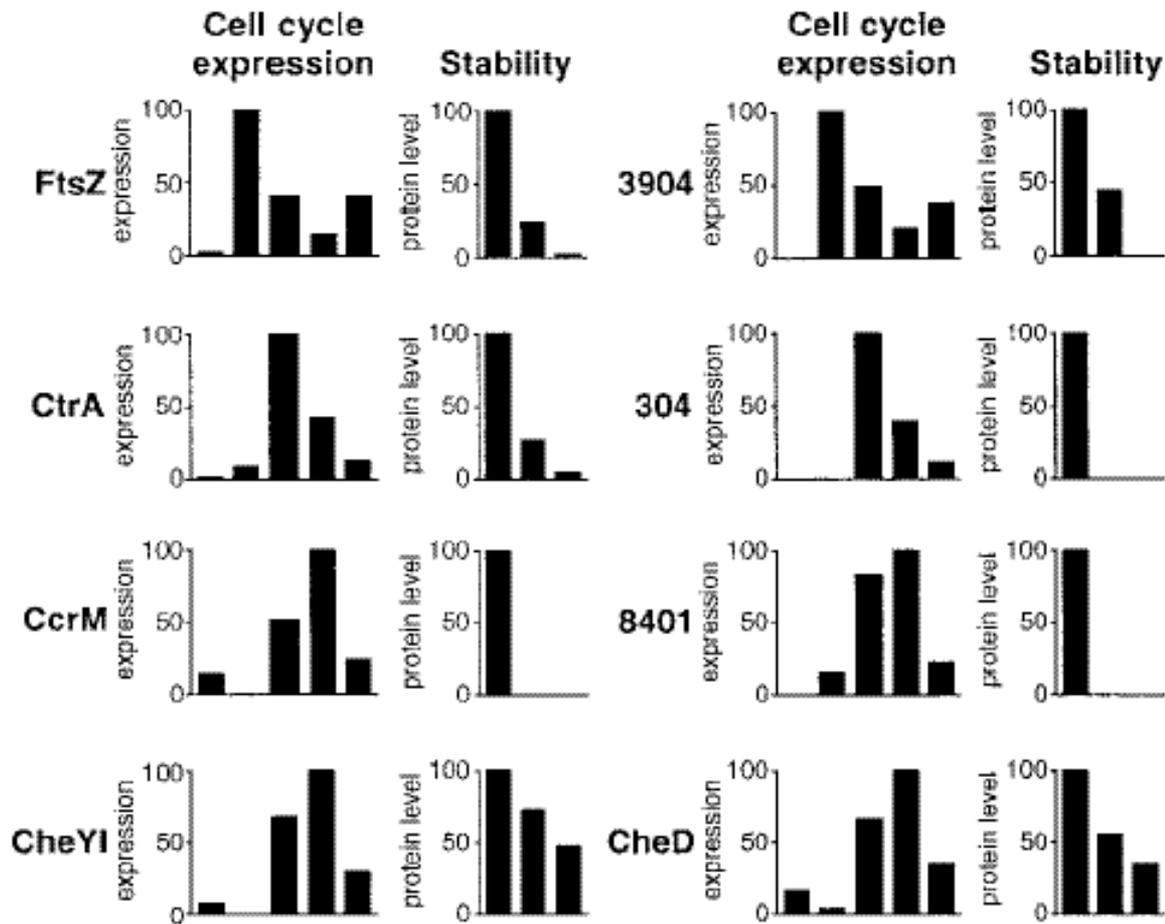
Клеточный цикл *Caulobacter crescentus* и зависящая от него экспрессия регуляторного белка CtrA. (Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. B. Grunenfelder, et al., PNAS, 2001, v. 98: 4681–4686)



Клеточный цикл *Caulobacter crescentus*. Коэкспрессия групп белков с разным профилем экспрессии в зависимости от фазы клеточного цикла. Высота столбцов показывает относительные скорости синтеза групп белков. (Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. B. Grunfelder, et al., PNAS, 2001, v. 98: 4681–4686)



Клеточный цикл *Caulobacter crescentus*.



Отдельные примеры белков с разными профилями экспрессии и временем жизни.

(Proteomic analysis of the bacterial cell cycle.

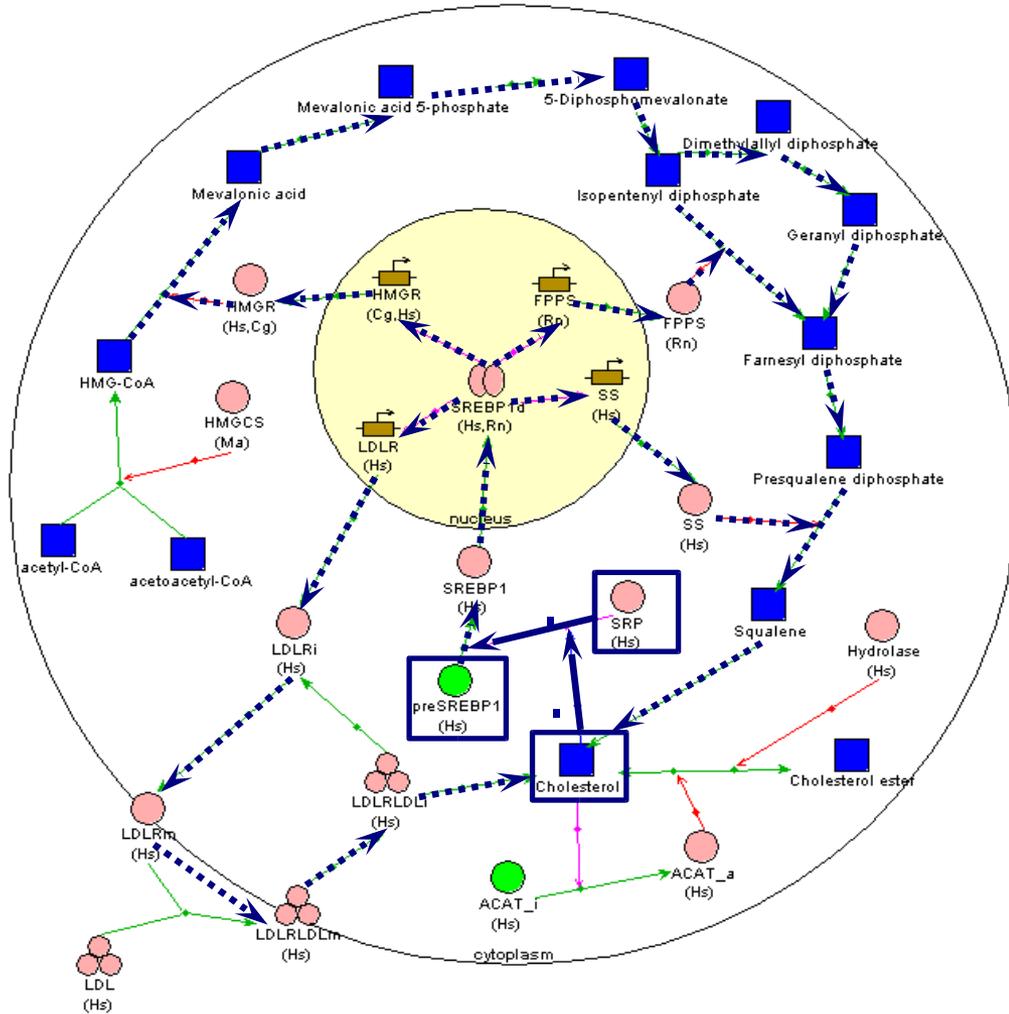
B. Grunfelder, et al., PNAS, 2001, v. 98: 4681–4686)



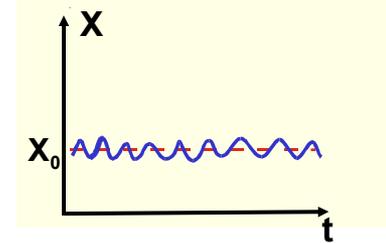
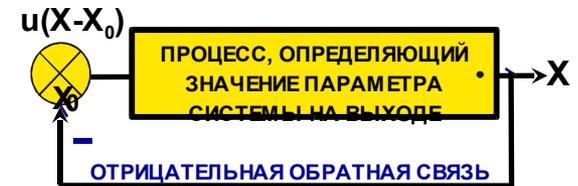
Сложная динамика белкового состава состава клетки ставит задачи моделирования этой динамики с учетом сети взаимодействий между компонентами системы и кинетических характеристик процессов синтеза, транспорта и деградации молекул.



Генная сеть регуляции биосинтеза холестерина в клетке



Принципальная схема регуляторного контура с отрицательной обратной связью

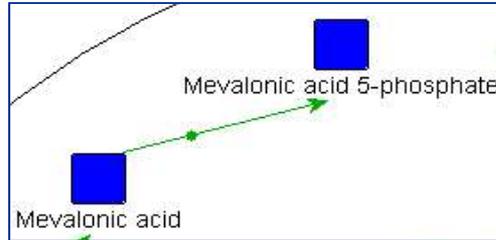




Примеры химико-кинетического описания элементарных событий в генных сетях

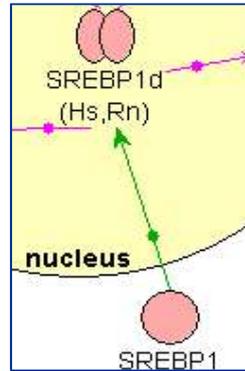


Мономолекулярная реакция



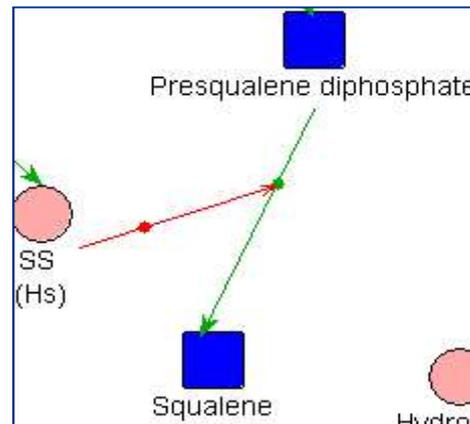
$$\left\{ \begin{array}{l} A \xrightarrow{k} B, \quad a = [A], b = [B] \\ -da/db = db/dt = ka \end{array} \right.$$

Бимолекулярная реакция



$$\left\{ \begin{array}{l} A + B \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} C, \quad a = [A], b = [B], c = [C] \\ da/dt = db/dt = -dc/dt = -k_1 ab + k_2 c \end{array} \right.$$

Реакция ферментативного синтеза (уравнение Михаэлиса-Ментена)



$$\left\{ \begin{array}{l} A + E \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} AE \xrightarrow{k_3} B + E, \\ a = [A], e = [E], e_a = [AE], b = [B] \\ da/dt = -db/dt = -k_3 e_o a / (K_m + a), \quad e_o = e + e_a \\ K_m = (k_2 + k_3) / k_1 \end{array} \right.$$



Фрагмент системы дифференциальных уравнений, описывающих математическую модель регуляции биосинтеза холестерина в клетке

$$\begin{aligned} & \dots\dots\dots \\ & d(\text{Cholin})/dt = \\ & + \{KISBin * \text{Squalene}\} - \{KISBestr * \text{Cholin} * \text{ACAT} / (KMSBestr + \text{Cholin} + \text{ACAT})\} + \{KISBhydr * \text{Cholestr} * \text{Hydrolas} / (KMSBhydr + \\ & \text{Cholester} + \text{Hydrolas})\} + \{1785 * KISBfree * \text{LDLRLDLi}\} + \{-Kin1prot * \text{Cholin} * \text{SRPprot} + Kin2prot * \text{SRP-Chol}\} + \{Ksrpcdeg * \text{SRP-Chol}\} \\ & - \{Kutichol * \text{Cholin}\} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & d(\text{LDLR} ____)/dt = \\ & + \{-Kclaw1 * \text{LDLR} ____ * \text{LDL} ____ + Kclaw2 * \text{LDLRLDL0}\} + \{Kfre ____ * \text{LDLRin}\} - \{KLDLRdeg * \text{LDLR} ____ \} \end{aligned}$$

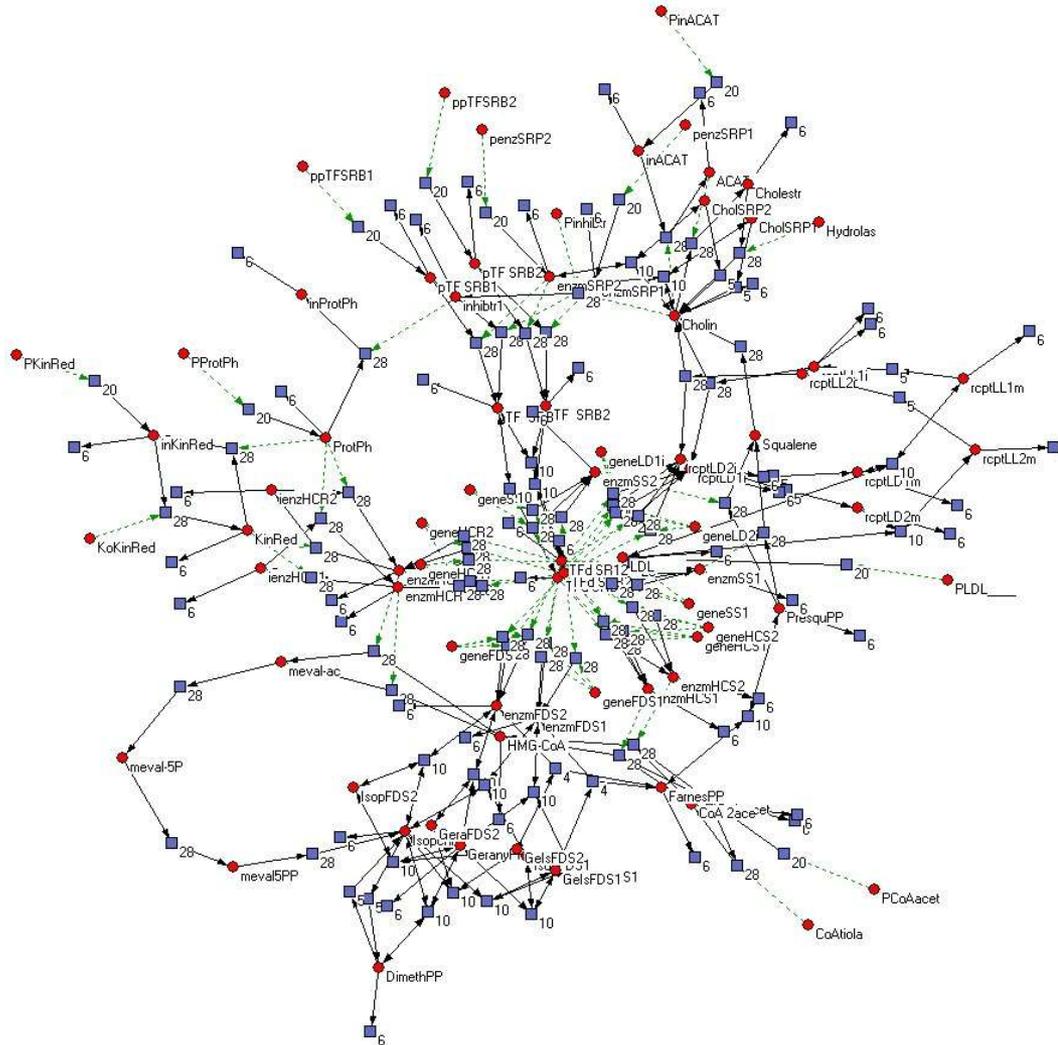
$$\begin{aligned} & d(\text{LDL} ____)/dt = \\ & + \{-Kclaw1 * \text{LDLR} ____ * \text{LDL} ____ + Kclaw2 * \text{LDLRLDL0}\} + \{KsynLDL * \text{PLDL} ____ \} - \{KutiLDL * \text{LDL} ____ \} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & d(\text{LDLRin})/dt = \\ & + \{KISBldlr * \text{LDLRgene} * \text{SREBPdim} / (KMSBldlr + \text{LDLRgene} + \text{SREBPdim})\} \\ & - \{Kfre ____ * \text{LDLRin}\} + \{Kfree * \text{LDLRLDLi}\} - \{KdegLRin * \text{LDLRin}\} \\ & \dots\dots\dots \end{aligned}$$

Константы мономолекулярных реакций, с ⁻¹	$KISBfree = 1 * 10^{-02}$, $Ksrpcdeg = 2.5 * 10^{-05}$, $Kfre ____ = 1 * 10^{-02}$, $KLDLRdeg = 1.93 * 10^{-6}$, $KsynLDL = 3.32 * 10^{02}$, $KutiLDL = 3.21 * 10^{-06}$, $KdegLRin = 1.93 * 10^{-06}$	
Константы бимолекулярных реакций	л*ммоль ⁻¹ * с ⁻¹	
	$Kclaw1 = 3.3 * 10^{-01}$	$Kclaw2 = 1 * 10^{-03}$
Константы ферментативных реакций	Константы оборота фермента, с ⁻¹	
	$KISBestr = 1 * 10^{+02}$, $KISBhydr = 1.9 * 10^{+03}$, $KISBldlr = 1 * 10^{-1}$	$KMSBestr = 6.67 * 10^{-03}$, $KMSBhydr = 7.6 * 10^{-01}$, $KMSBldlr = 3.3 * 10^{-05}$



Двудольный граф математической модели генной сети регуляции биосинтеза холестерина в клетке



переменные ● - 39 ШТ
процессы ■ - 82 ШТ



Сложная сеть взаимодействий между компонентами системы регуляции белкового обмена (т.е. **регуляции функции клетки**) создает трудности для анализа такой системы при моделировании её в виде дифференциальных уравнений. Дополнительную информацию о поведении системы и её свойствах могут дать дискретные модели, и в частности, сети Петри. Пакеты для моделирования и анализа сетей Петри позволяют как имитировать динамику системы, так и анализировать такие важные свойства системы, как пространство её состояний, свойства достижимости состояний и инварианты переходов.