

Концепция
лаборатории «Протеомики и метаболомики»
на 2015-2025 гг

1. Введение.

Во второй половине XX в. бурно развивались аналитические методы биохимии, молекулярной биологии и вычислительной техники. Выдающиеся успехи, достигнутые в этих областях, привели к возможности расшифровки огромных последовательностей оснований нуклеиновых кислот и к записи полного генома живого организма. Впервые полный геном был расшифрован в 1980 г. у бактериофага *phi X-174* (около 5×10^3 оснований), затем у первой бактерии – *Haemophilus influenzae* ($1,8 \times 10^6$ оснований). А с завершением XX в. была закончена грандиозная работа по расшифровке полного генома человека – выявлению последовательности примерно 3 млрд оснований нуклеиновых кислот.

Несмотря на то, что в настоящее время десятки геномов, включая геном человека, полностью секвенированы, актуальной проблемой является установление взаимосвязи ген – функция, генотип – фенотип, а также реальных функций каждого гена. Быстрая скорость геном-секвенирующих работ в прошедшие несколько лет привела к открытию многих новых генов, чьи функции еще не известны или описаны очень бедно. Эти исследования, в свою очередь, явились импульсом для анализа экспрессионного уровня компонентов, из которых состоит биологическая система: мРНК (транскриптомика), белков (протеомика) и метаболитов (метаболомика).

Ввиду того, что белки могут быть молекулярными мишенями для запуска антистрессорных механизмов (в случае растений) или очевидными кандидатами-мишенями, на которые будет направлено действие медикаментов (в случае человека), протеомика становится областью с возрастающим вниманием к себе.

Следует отметить, что на разных стадиях развития даже у одноклеточных эукариотических организмов синтезируются белки, закодированные только в какой-то определенной части генома. Что касается более сложных организмов, то задача идентификации полного протеома является неизмеримо сложной, в первую очередь, из-за большого разнообразия клеток, тканей и биологических жидкостей. Тем не менее, наличие высокопроизводительной (-omics) технологии уже сейчас позволяет быстро проводить такие анализы, как: установление структуры

неизвестных соединений; скрининг сложных смесей и поиск по библиотекам масс-спектров; идентификацию белков по базам данных; анализ посттрансляционных модификаций белков; количественный анализ экспрессии белков; установление частичной аминокислотной последовательности пептидов.

Таким образом, несмотря на сложность методов и многие нерешенные проблемы, дальнейшее развитие протеомных технологий и создание баз данных белков (организмов/разновидностей растений), построение протеомных карт для промышленно используемых организмов (растений, микроорганизмов), трансгенных растений сельскохозяйственного, фармакологического, медицинского назначения и т.д. является весьма актуальным и перспективным направлением в современной биологии. В нескольких лабораториях мира уже созданы, постоянно обновляются и совершенствуются базы данных белков, доступные научному сообществу через сеть Интернет.

Метаболом, также как и протеом, постоянно меняется. В то время как данные об экспрессии мРНК генов и данные протеомного анализа не раскрывают полностью всего того, что может происходить в клетке, метаболические профили могут дать мгновенный снимок физиологических процессов в клетке. Знание этого профиля обеспечивает глубокое проникновение в динамические процессы, протекающие в биологических образцах.

На сегодняшний день охарактеризовано более 50000 метаболитов растений, многие тысячи идентифицированы в единичных растениях. Особое место среди вторичных метаболитов растений занимают флавоноиды. Они являются главными компонентами растительных пигментов, участвуют в образовании сигналов для опылителей и симбиотических бактерий, защищают растения от УФ-лучей и окислительных стрессов окружающей среды, включаются в созревании пыльцевой трубки, сохранение семян, транспорт ауксинов и т.д. Пути метаболизма флавоноидов интенсивно изучаются в таких модельных растениях, как арабидопсис и петунья, а также в различных растениях с мутациями генов, участвующих в метаболизме флавоноидов. Результатом этих исследований явилось, в частности, выявление корреляционной связи между содержанием флавоноидов и качеством хлопкового волокна, а также установление

непосредственного включения флавоноидов в механизм удлинения/элонгации волокна. Это открывает новые возможности и пути в селекции хлопчатника, являющейся стратегической сельскохозяйственной культурой Узбекистана.

В конечном счете, полное описание всех мРНК (транскриптомика), белков (протеомика) и метаболитов (метаболомика), экспрессируемых геномом, создание каталога всех белок-ДНК, белок-РНК, белок-белковых взаимодействий (интерактомика) приведут к системной биологии.

Одним из главных направлений организованного в Узбекистане «Центра геномики и биоинформатики» является развитие и использование геномных технологий в создании сельхозкультур.

Пользуясь технологиями РНК-интерференции в Центре получены сорта и линии хлопчатника с более качественными фенотипическими признаками, такими, как высокая продуктивность, устойчивость к абиотическим и биотическим стрессам, предположительно высокий уровень антоциана в листьях и т.д. Также ведутся работы по получению генетически улучшенных форм других сельхоз культур – пшеницы, картофеля, винограда и т.п.

Эти растения являются уникальными объектами для прогнозирования функционирования у них неизученных генов, синтеза новых белков или возникновения нетипичной модификации этих молекул. Полученные растения могут иметь качественно или количественно измененный спектр низкомолекулярных метаболитов, гормонов, пигментов, сигнальных молекул, биологически активных веществ, которые могут быть сырьем для фармакологической, пищевой, медицинской промышленности.

Например, созданные в центре сорта хлопчатника серии «Порлок» с улучшенными текстильными показателями волокна, в своей природе имеют генетически индуцированные изменения в экспрессии генов фитохромов А, В и т.д., что, в свою очередь, предполагает последующие изменения в большом числе фитохром - опосредованных, т.е. свето - зависимых процессов, которые, тем не менее, остаются неизученными. Однако необходимо отметить, что, несмотря на успешную коммерциализацию ряда ген-нокаутных сортов хлопчатника, молекулярные механизмы (протеомные и метаболомные) реализации эффектов

РНК-интерференции генов хлопчатника остаются малоизученными. Так, например, использование RNAi позволило выяснить важную функциональную роль генов MIB и HD-ZIP транскрипционного фактора (GhHOX3) в развитии волокна и семян у хлопчатника. При этом предположительным механизмом, который обеспечивает элонгацию клеток волокна, является трансдукция сигнала гибберелиновой кислоты гомеодоменным белком. Аналогично было установлено, что другой фактор удлинения и роста клеток – вакуолярная инвертаза (GhVIN1) опосредует гексозное сигнализирование, которое является важным для регуляции ключевых регуляторных генов инициации и дифференциации клеток волокна из тканей семяпочки на ранних стадиях развития волокна. Также сообщалось о существенной роли гена фасцилин-подобного арабиногалактана (FLAs) в развитии волокна хлопчатника с использованием GhAGP4 RNAi трансгенных растений. Кроме того, детальная характеристика GbPDF1 RNAi растений позволила предположить участие пероксида водорода и ферментов, связанных с синтезом этилена и пектина или транспортом сахаров при развитии волокна (Deng et al., 2012).

Анализ имеющихся данных позволяет говорить о наличии возможности пролить свет на некоторые молекулярные механизмы формирования более качественного хлопкового волокна в ген-нокаутных сортах хлопчатника, и одновременно с этим у генных инженеров открываются новые пути получения качественно продвинутого хлопкового волокна через супрессию или, наоборот, индукцию генов метаболизма в развивающемся хлопковом волокне.

Т.о. результаты анализа протеомного и метаболомного профиля этих генетически усовершенствованных растений могут стать приоритетными при создании новых трансгенных растений с заданным фенотипом, при разработке новых лекарственных препаратов, диагностических тестов и способов защиты растений от биотических и абиотических стрессов.

Помимо этого, необходимо отметить, что создание новых генно-инженерных сортов растений ставит вопрос оценки безопасности их применения. Поэтому одним из главных международных требований, связанных с развитием и применением биотехнологии в науке и производстве, является безопасность

высвобождения генно-инженерных сортов, обладающих новыми желательными признаками, на товарный рынок. В связи с этим, рядом международных организаций, таких как OECD, ВОЗ и ФАО, были разработаны основные принципы оценки безопасности генно-инженерных сортов, в основу которых положена концепция существенной эквивалентности. При исследовании существенной эквивалентности проводится сравнительная оценка по основным молекулярным и композиционным показателям, включая профили основных макро- и микронутриентов, антагонистов и ингибиторов ферментов, а также природных токсинов и аллергенов. При этом эквивалентность устанавливается по химическому составу ключевых соединений, характеру метаболизма, составу метаболитов и активности ключевых ферментов. Характер и порядок композиционного анализа при оценке существенной эквивалентности осуществляется в рамках специальных Согласительных документов (Consensus Documents). Согласно этим Согласительным документам при установлении существенной эквивалентности нового генно-инженерного сорта широко используются подходы и методы биохимического, метаболомного и протеомного анализа. Применение метаболомных подходов для анализа генно-инженерных организмов позволяет получить более широкую и глубокую информацию о сравнительном композиционном составе модифицированных организмов по сравнению с полученным при помощи традиционных аналитических подходов. Сочетание в метаболомике передовых аналитических методов и инструментов биоинформатики обеспечивает широкие химические композиционные данные, которые используются для подтверждения существенной эквивалентности. Таким образом, подходы и методы метаболомики и протеомики можно рассматривать как эффективную и ключевую стратегию для оценки существенной эквивалентности, которая увеличивает вероятность обнаружения композиционных изменений, связанных с генетической модификацией в ГМ-растений.

2. Миссия и принципы лаборатории «Протеомики и метаболомики».

Миссией лаборатории «Протеомики и метаболомики» является обеспечение высокого уровня научно-исследовательских работ с использованием современных протеомных и метаболомных технологий; создание благоприятной среды для роста высококвалифицированных и владеющих современными научными технологиями специалистов; углубление и расширение знаний о динамических процессах в исследуемых организмах на основе данных протеомного и метаболомного профиля тестируемых объектов; адекватное использование полученных данных при разработке новых генетических векторов для улучшения хозяйственно-ценных признаков сельскохозяйственных растений, при получении сырья для фармакологической или пищевой промышленности, а также при создании средств защиты растений от различных биотических и абиотических стрессов. Кроме того, важной миссией лаборатории будут являться исследования механизмов реализации эффектов РНК-интерференции в новых биотехнологических сортах сельскохозяйственных культурах, а также разработка методов оценки их безопасности.

Лаборатория будет работать по следующим принципам:

- поддержка и привлечение молодых специалистов в протеомику и метаболомику и обеспечение условий для их исследований на уровне мировой науки;
- участие в республиканских и международных конференциях для апробации полученных данных среди специалистов в данных областях биологической науки;
- участие в разработке будущих стратегических планов для развития конкурентоспособных биотехнологических компании в Узбекистане и связи их с международными биотехнологическими компаниями;
- работа в тесном контакте с государственными сельскохозяйственными секторами и отделами Академии наук, а также бизнесом для переноса результатов исследований из научной лаборатории в коммерцию в Узбекистане;
- проведение тренинга со студентами образовательных учебных заведений для ознакомления их с новейшими достижениями в области протеомики и метаболомики.

3. Цель и главные задачи

Целью лаборатории является на основе фундаментальных исследований протеомного и метаболомного профилей различных генотипов создание инновационных, конкурентоспособных технологий для промышленного, сельскохозяйственного, медицинского и других секторов Узбекистана.

Для достижения этой цели необходимо решить следующие задачи:

- исследовать протеомный и метаболомный профиль основных геннокаутных сортов хлопчатника с целью выявления механизмов повышения урожайности;
- исследовать механизмы устойчивости новых биотехнологических сортов хлопчатника к биотическим и абиотическим стрессам (соле- и засухоустойчивость, устойчивость к фитопатогенам);
- изучить протеомный и метаболомный профиль других сельскохозяйственных культур, создаваемых в Центре с применением метода РНК-интерференции;
- используя биоинформатические подходы, выявить кандидатные гены, перспективные для создания новых высокоурожайных, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам сортов приоритетных сельскохозяйственных культур;
- разработать и внедрить в практику протеомные и метаболомные подходы и методы, которые могут быть использованы для оценки безопасности генно-модифицированных сортов растений, созданных с применением передовых методов генной инженерии.

Для решения этих задач необходимо обеспечить следующим:

- создание материально-технической базы и научно-кадровой инфраструктуры лаборатории протеомики и метаболомики;
- создание экономических и социальных условий для проведения исследования на уровне мировой науки, соответствующем определению «-омика»;

- создание экономических и социальных стимулов для привлечения специалистов узкого профиля в исследования по протеомике и метаболомике;
- обеспечение возможности регулярной стажировки местных специалистов в зарубежных центрах для овладения новейшими протеомными и метаболомными технологиями.

4. Ресурсы для реализации

Реализация и будущий успех лаборатории протеомики и метаболомики требует следующих ресурсов:

- государственное финансирование: получение грантов от государственных организаций;

- стороннее финансирование: привлечение финансирования от локальных и международных организаций, привлечение международных финансовых возможностей.

- инфраструктура лабораторного помещения, парка современного оборудования и реагентов:

На основе опыта протеомных и метаболомных центров минимальный приборный парк лаборатории протеомики и метаболомики должен состоять из систем пробоподготовки образцов, экстракции и подготовки белков и метаболитов, системы разделения (хроматографии и электрофореза), системы масс-спектрометрии, системы документации результатов анализа, системы для анализа функционального состояния клеток (митохондриальный потенциал, внутриклеточный кальций, рН и т.п.), системы для проведения спектрофотометрических и флуориметрических исследований образцов.

В настоящее время ЦГБ имеет систему двумерного электрофореза, минимальное оборудование для начальной экстракции (пробоподготовки), а также документирования гелей (AlfaImager).

4. Научное направление лаборатории протеомики и метаболомики.

В настоящее время в ЦГБ имеются высоко востребованные сорта хлопчатника Узбекистана, полученные с использованием современной ген-

нокаутной технологии и маркер-ассоциированной селекции хлопчатника. Эти генотипы являются базовыми объектами для начальной деятельности лаборатории протеомики и метаболомики с последовательным обновлением и выбором новых научных направлений лаборатории в соответствии с мировыми исследованиями в данной области биологической науки, интересами ЦГБ и биотехнологии Узбекистана.

На ближайшие 10 лет (2015-2025 г) в планы лаборатории входит:

- 1) анализ низкомолекулярных биологически активных веществ (первичных/ вторичных метаболитов) в тканях генетически усовершенствованных форм хлопчатника, а также таксономически различающихся видов хлопчатника в ответ на воздействие биотических (фитопатогены) и абиотических (засуха, температура) факторов среды;
- 2) анализ структуры и функции некоторых белков, ферментов, пептидов - потенциальных кандидатных мишеней/триггеров, задействованных в изменении качества волокна и продуктивности генетически разнообразных форм хлопчатника в норме и при воздействии стресса;
- 3) поиск, количественный анализ и детальное исследование биомаркеров, выявленных по итогам выполнения предыдущих разделов программы, с целью дальнейшего использования этих веществ для диагностики, прогнозирования и профилактики негативного последствия стрессов;
- 4) определение возможных механизмов устойчивости генетически усовершенствованных форм хлопчатника к различным абиотическим и биотическим стрессам;
- 5) разработка и внедрение в практику протеомных и метаболомных подходов и методов оценки безопасности генно-модифицированных сортов растений, созданных с применением передовых методов генной инженерии.

5. Механизмы реализации

Основными факторами, влияющими на реализацию текущих планов являются:

- обеспечение основного и непрерывного финансирования деятельности Центра правительственными учреждениями;
- наличие необходимых химически чистых реактивов, стандартов, молекулярных маркеров и бесперебойная доставка их по мере необходимости;
- обеспечение возможности сотрудничества с другими международными передовыми частными и правительственными Центрами и институтами мира для продуктивного научного сотрудничества и непрерывного обучения.

6. Ожидаемые результаты, показатели для их мониторинга.

Выполнение вышеуказанных исследований позволит разработать новые генетические вектора для усовершенствования сельхозкультур. Идентифицированные белки или пептиды, ассоциированные с таким фенотипом растений, как «резистентность», могут быть использованы в генно-инженерных работах для получения трансгенных растений с заданным признаком. Биологически активные компоненты, выделенные из генетически усовершенствованных сельхозкультур, могут быть новым сырьем для пищевой, фармакологической промышленности. Разработка и внедрение в практику протеомных и метаболомных подходов и методов оценки безопасности генно-модифицированных сортов растений позволит гарантировать безопасность при осуществлении и использовании результатов и продуктов генно-инженерной деятельности.

Результаты научных исследований должны быть опубликованы в ведущих зарубежных изданиях, что будет гарантом качества и добротности выполненных работ.

7. Заключение

Реализация в жизнь концепции лаборатории протеомики и метаболомики поможет поднять на качественно новый уровень научные исследования, проводимые в Узбекистане, внести ясность в некоторые молекулярные

механизмы адаптации растений к абиотическим и биотическим стрессам, решить ряд фундаментальных проблем, связанных с механизмом формирования и улучшения качества волокна у хлопчатника, механизмом узнавания патоген – растение. Это, в свою очередь, будет способствовать созданию новых диагностических тестов, способов защиты растений от патогенов, результаты исследований могут быть основой для конструирования новых генетических конструкций, направленных на усовершенствование сельхоз культур и получение растений с заданным фенотипом. Кроме того, разработка и внедрение в практику протеомных и метаболомных подходов и методов оценки безопасности генно-модифицированных сортов растений позволит гарантировать безопасность при осуществлении и использовании результатов и продуктов генно-инженерной деятельности.

Результаты исследований, проводимых в лаборатории протеомики и метаболомики, могут стать достойным вкладом в биотехнологию и мировую функциональную геномику и протеомику.