

46. Schmid S. L. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process // *Annu. Rev. Biochem.* — 1997. — Vol. 66. — P. 511–548.
47. Sever S., Skoch J., Newmyer S. et al. Physical and functional connection between auxilin and dynamin during endocytosis // *EMBO J.* — 2006. — Vol. 25, N 18. — P. 4163–4174.
48. Shih W., Gallusser A., Kirchhausen T. A clathrin-binding site in the hinge of the beta 2 chain of mammalian AP-2 complexes // *J. Biol. Chem.* — 1995. — Vol. 270, N 52. — P. 31083–31090.
49. Smith A. J., Taneja T. K., Mankouri J., Sivaprasadarao A. Molecular cell biology of KATP channels: implications for neonatal diabetes // *Expert Rev. Mol. Med.* — 2007. — Vol. 9, N 21. — P. 1–17.
50. Sousa R., Lafer E. M. Keep the traffic moving: mechanism of the Hsp70 motor // *Traffic.* — 2006. — Vol. 7, N 12. — P. 1596–1603.
51. Stahelin R. V., Long F., Peter B. J. et al. Contrasting membrane interaction mechanisms of AP180 N-terminal homology (ANTH) and epsin N-terminal homology (ENTH) domains // *J. Biol. Chem.* — 2003. — Vol. 278, N 31. — P. 28993–28999.
52. Tosoni D., Puri C., Confalonieri S. et al. TTP specifically regulates the internalization of the transferrin receptor // *Cell.* — 2005. — Vol. 123, N 5. — P. 875–888.
53. Traub L. M., Lukacs G. L. Decoding ubiquitin sorting signals for clathrin-dependent endocytosis by CLASPs // *J. Cell Sci.* — 2007. — Vol. 120, Pt 4. — P. 543–553.
54. von Zastrow M., Sorkin A. Signaling on the endocytic pathway // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 2007. — Vol. 19, N 4. — P. 436–445.
55. Wileman T., Harding C., Stahl P. Receptor-mediated endocytosis // *Biochem J.* — 1985. — Vol. 232, N 1. — P. 1–14.
56. Wright G. D., Sutherland A. D. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria // *Trends Mol. Med.* — 2007. — Vol. 13, N 6. — P. 260–267.
57. Wu Y., Liang S., Oda Y. et al. Truncations of amphiphysin I by calpain inhibit vesicle endocytosis during neural hyperexcitation // *EMBO J.* — 2007. — Vol. 26, N 12. — P. 2981–2990.
58. Yoshida Y., Kinuta M., Abe T. et al. The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature // *EMBO J.* — 2004. — Vol. 23, N 17. — P. 3483–3491.

Поступила 11.03.09

Обзорная статья

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2009

УДК 61:575.113

СТРУКТУРНАЯ ГЕНОМИКА И МЕДИЦИНА

И. Е. Ясный¹, Т. А. Цыбина², Д. В. Шамшури³, П. М. Колосов⁴

¹Канд. хим. наук, научный сотрудник 2-го отд. лаборатории биохимии, Центр перспективных медицинских технологий, ilia.yasny@gmail.com; ²канд. биол. наук, ст. научный сотрудник 2-го отд. лаборатории биохимии, Центр перспективных медицинских технологий, tsyb-2@mail.ru; ³канд. хим. наук, ст. научный сотрудник 2-го отд. лаборатории биохимии, Центр перспективных медицинских технологий, shamshurin@mail.ru; ⁴канд. биол. наук, научный сотрудник 2-го отд., лаборатории биохимии, Центр перспективных медицинских технологий, petkol@rambler.ru, г. Москва, ул. Б. Оленья, 8.

Обзор посвящен структурной геномике и ее роли в создании лекарств нового поколения. Особый акцент сделан на структурной геномике мембранных белков человека как представляющих наибольший интерес для медицины. Рассмотрены особенности структурной геномики, которые позволяют выделить ее в отдельную область исследований. Проанализирована современная последовательность исследований, сложившаяся при разработке лекарств на основе структурных данных. Перечислены методы продукции рекомбинантных белков с целью структурных и функциональных исследований. Кратко рассмотрены методы изучения структуры белков и требования по подготовке к ним белков. Представлен обзор мировых центров и консорциумов структурной геномики, приведены актуальные данные по ведущимся в них исследованиям и достигнутым успехам.

Ключевые слова: структурная геномика, мембранные белки, рекомбинантная экспрессия, рациональная разработка лекарств

STRUCTURAL GENOMICS AND MEDICINE. I. E. Yasny, T. A. Tsybina, D. V. Shamshurin, P. M. Kolosov

The review is devoted to the structural genomics and its role in developing the next generation of drugs. Special attention is paid to the structural genomics of the human membrane proteins being of greatest interest. Features of the structural genomics permitting to identify it as a separate area of a research are considered. Currently used steps in a course of the structure-based rational drug design are analyzed. Methods for recombinant expression of proteins aimed at structural and functional studies have been listed. Methods for 3D-structure determination of proteins and the requirements to prepare them to the mentioned procedure have been briefly reviewed. World centers and Consortia for structural genomics are reviewed with actual data on their current research and progress.

Key words: structural genomics, membrane proteins, recombinant expression, rational drug design

Структурная геномика — сравнительно молодая, бурно развивающаяся область исследований, имеющая целью расшифровку трехмерной структуры белков в масштабе целого генома. Иногда эту область деятельности называют также структурной протеомикой, однако термин "протеомика" чаще используют для описания исследований, посвященных изучению

реализации генома в виде определенного набора белков в клетке в зависимости от стадии развития или каких-либо воздействий *in vivo*. В связи с этим в данном обзоре мы будем использовать термин "структурная геномика" как устоявшееся обозначение, входящее, например, в названия исследовательских центров и консорциумов, о которых пойдет речь ниже.

Несмотря на относительную молодость структурной геномики, по результатам работы научного сообщества на английском языке опубликованы несколько обзоров [9, 10, 12, 23, 41] и монография [21]. В отечественной литературе обзоры, касающиеся геномики и протеомики, публиковались относительно давно и уже не отражают современных представлений в данной области [1, 2].

В нашем обзоре речь пойдет в основном о структурной геномике белков человека как представляющих наибольший интерес для медицины. Полноценные исследования по структурной геномике человека стали возможны только после расшифровки генома, которая являлась целью традиционной геномики. Знание последовательностей человеческих генов позволяет использовать широкий арсенал методов биоинформатики и генной инженерии для получения эффективных экспрессионных конструкций с целью продукции рекомбинантных белков.

Необходимо отметить, что задача расшифровки структур белков стоит и перед структурной биологией — традиционным разделом биологии, который давно занимается пополнением базы данных белковых структур. Отличие структурной биологии состоит в том, что ее целью является определение трехмерной структуры белка с известной функцией. Специалисты в области структурной геномики, пытаясь определить структуры белков в масштабе генома, получают в том числе трехмерные структуры белков, функции которых неизвестны. Научная ценность таких результатов может показаться сомнительной. Однако, как показывает практика, эффективность традиционных исследований существенно повышается, если ученые, начинающие изучение функции какого-либо белка, уже имеют доступ к структуре, клонам белка и методам рекомбинантной экспрессии. Из широкомасштабной задачи структурной геномики вытекает необходимость наличия исследовательских центров или даже исследовательских сетей (консорциумов), которые ставят перед собой задачу высокопроизводительной расшифровки структур. Другая характерная черта структурной геномики — стремление к максимальной автоматизации как следствие требования высокой производительности. Если для структурной биологии характерен индивидуальный подход к белкам, то в структурной геномике упор делается на масштабность проектов.

Структурная геномика в медицине

В современной медицинской химии для поиска новых лекарственных кандидатов долгое время использовали экстенсивный и трудоемкий подход, при котором сотни тысяч органических соединений, синтезированных ранее, проверяли на наличие сродства к белку-мишени или на действие в отношении живой системы. Системы высокопроизводительного скрининга позволили ускорить этот процесс, что, однако, не привело к качественному изменению методологии. Принципиально иной подход стал возможен в связи с успехами определения трехмерных структур белков и с расшифровкой генома человека. Стало возможным проводить

моделирование взаимодействия лиганда с белком компьютерными методами, что значительно сократило время поиска лекарственных кандидатов, удешивило процесс поиска и позволило предложить в качестве потенциальных лекарств вещества из более широкого набора классов органических соединений.

Современный процесс рациональной разработки лекарств состоит из следующих стадий [23].

1. Определение белка-мишени (или нескольких белков), перспективного с терапевтической точки зрения. На этой стадии привлекаются обширные данные клинической практики, биохимии, физиологии, а также данные геномики и протеомики.

2. Расшифровка трехмерной структуры отобранных белков-мишеней. Данная стадия включает в себя подготовку белка — создание генетических конструкций для экспрессии, выбор системы экспрессии, синтез белка, получение кристалла для рентгеноструктурного анализа или меченого белка для ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

3. Скрининг баз данных [39] органических соединений или компьютерное моделирование лигандов, способных связываться с отобранными мишенями и оказывать эффекторное воздействие на молекулу белка-мишени.

4. Проверка биологической активности потенциальных лигандов на клетках и организмах. Оценка токсичности, фармакокинетических характеристик.

5. Повторный скрининг аналогов лекарственных кандидатов на легкость синтеза, токсичность, простоту доставки к целевым органам, фармакодинамику.

6. Предклинические и клинические испытания.

Около 70% современных лекарств представляют собой лиганды мембранных белков. Вместе с тем в Банке данных белковых структур PDB (Protein Data Bank) [6] доля мембранных белков составляет менее 1%. Сейчас для них расшифровано только 168 структур (август 2008 г.). Такая ситуация обусловлена, в частности, топологическими особенностями строения мембранных белков [3]. Большинство из них, например рецепторы, сопряженные с G-белками (GPCR) и ионные каналы, имеют в своем составе протяженные гидрофобные участки, пересекающие липидный бислой мембран. Кроме того, многие белки работают в составе мультисубъединичных комплексов, четвертичная структура которых поддерживается как особенностями аминокислотного состава, так и взаимодействиями с липидами мембран. В связи с этим возникают дополнительные проблемы при продукции рекомбинантных мембранных белков в требуемых количествах при сохранении их нативной структуры и функциональности. Процесс очистки таких белков требует применения детергентов, что также влияет как на стабильность, так и на выход. В связи с этим из семейства GPCR, насчитывающего примерно 800 белков, получены структуры высокого разрешения только для трех белков: родопсина (причем белок был получен из нативной ткани, так как присутствует там в большом количестве) [26], адренорецепторов β_2 человека [30] и β_1 индюка *Meleagris gallopavo* [40].

Продукция рекомбинантного белка

Для структурных исследований требуются относительно большие количества очищенного белка (не менее 10 мг) [31]. В связи с низкой концентрацией и малой доступностью в организме мембранных белков целесообразно получать рекомбинантные белки. В настоящий момент существует ряд систем экспрессии, позволяющих наработать белок в количестве, достаточном для определения структуры. Рассмотрим их достоинства и недостатки в приложении к мембранным белкам.

Клетки Escherichia coli. Данная система экспрессии наиболее дешевая из всех и позволяет нарабатывать белок быстрее других [31]. Однако при получении мембранных белков в *E. coli* часто сталкиваются с трудностями. Во-первых, из-за низкой растворимости мембранные белки часто оказываются в тельцах включения и в дальнейшем требуются усилия по их рефолдингу [18], которые не всегда оказываются успешными. Во-вторых, синтез белков человека в прокариотах не сопровождается посттрансляционными модификациями, что может неблагоприятно сказаться как на физических, так и на функциональных свойствах белка. Однако в некоторых случаях удалось добиться сверхпродукции рецепторов, сопряженных с G-белком, в мембране *E. coli* [13].

Клетки дрожжей. Продукция в дрожжевых клетках (например, *Pichia pastoris*) сопровождается некоторыми посттрансляционными модификациями, кроме того, дрожжи быстро растут и позволяют добиться высокого выхода белка [8]. Однако для дрожжевой системы характерно гипергликозилирование, которое в дальнейшем препятствует кристаллизации целевого белка и может менять его свойства. Кроме того, существует проблема нестабильности чужеродных плазмид в дрожжах. Вместе с тем в *P. pastoris* удалось добиться таких уровней GPCR, которые достаточны для проведения структурных исследований [22].

Клетки насекомых. Система продукции в клетках насекомых с использованием вирусных векторов позволяет добиться высоких выходов белка, здесь имеется система посттрансляционной модификации, клетки растут достаточно быстро [20]. В клетках насекомых также были успешно получены белки семейства GPCR [5].

Клетки млекопитающих. Условия получения белков млекопитающих в данной системе наиболее близки к нативным [32]. Однако по сравнению с другими системами для системы экспрессии в клетках млекопитающих характерны низкие выходы, длительное время культивирования и высокая стоимость реагентов. Тем не менее как и при использовании других систем экспрессии, в некоторых случаях удается добиться высокого уровня GPCR (до 5–10 мг/л) [14].

Следует отметить, что у всех клеточных систем экспрессии есть общие недостатки. Во-первых, чужеродные белки могут оказаться токсичными для клеток, в особенности это относится к мембранным белкам. Во-вторых, клеточные системы экспрессии до сих пор не поддаются полной автоматизации. Обе эти проблемы можно решить при пе-

реходе к бесклеточной системе экспрессии.

Бесклеточные системы экспрессии. Данные системы по сравнению с клеточными обладают рядом преимуществ, которые делают использование бесклеточных систем особенно перспективным в области структурной геномики [16]. Во-первых, снимается вопрос токсичности целевого белка для клетки. Во-вторых, становится возможным использование прямо во время экспрессии широкого набора детергентов и различных вариантов липосом. В-третьих, целевой белок является основным компонентом смеси, что облегчает его выделение и очистку и позволяет проводить реакцию трансляции в меньшем объеме. И, наконец, в отличие от клеточных систем бесклеточные системы экспрессии полностью автоматизируются. Это позволяет значительно снизить время, требуемое для наработки целевого белка, и быстро провести скрининг геномной библиотеки на возможность продукции кодируемых белков [17, 19].

К недостатку бесклеточных систем экспрессии следует отнести высокую стоимость реагентов — лизата для проведения транскрипции и трансляции, а также изотопно-меченных аминокислот в случае, если планируется определение структуры методом ЯМР.

Используемые в настоящее время бесклеточные системы экспрессии созданы на основе лизатов клеток из разных источников:

- *E. coli* — наиболее часто используемый, относительно недорогой. Не подходит для получения эукариотических мембранных белков;
- лизат из ретикулоцитов кролика — используется в небольших экспериментах, имеет очень высокую стоимость. Для масштабных исследований недоступен;
- лизат из проростков пшеницы — по стоимости и возможности наработки необходимого для работы количества, по-видимому, в настоящее время является оптимальным.

Выделение и очистка белка

Получение очищенных препаратов белков для целей структурной геномики требует автоматизации стадий выделения и очистки. В настоящее время существует оборудование для полной автоматизации методов масс-спектрометрии, хроматографии, электрофореза белков. Так как при работе с мембранными белками для поддержания их в растворимом состоянии используют детергенты, тип и концентрация которых зависят от свойств каждого конкретного белка, для масштабной работы необходима также автоматизируемая система скрининга детергентов [21]. Все организации, принимающие участие в современных проектах структурной геномики, располагают подобным оборудованием.

Определение структуры белка

Для определения трехмерной структуры белка на атомном уровне используют два основных метода: рентгеноструктурный анализ (РСА) и ЯМР.

Для разрешения структуры методом РСА требуется пометить белок селенометионином и получить

кристалл белка. Из данных литературы известно, что мембранные белки кристаллизуются хуже, чем растворимые, — требуется сокристаллизация с детергентами, как следствие — скрининг детергентов [4]. Необходимо использование специальных кристаллизационных роботов, которые совмещают в себе блок приготовления кристаллов, где варьируют состав растворов и условия кристаллизации, и блок распознавания образцов, в котором автоматически детектируются кристаллы хорошего качества [37].

Структуру белков небольшого размера (менее 50 кД), прошедших очистку, можно определить методом ЯМР [27, 33]. Для этого необходимо пометить белок изотопами ^{13}C , ^{15}N , иногда ^2H , что достигается выращиванием клеточных культур на минимальной среде, содержащей только меченые вещества. При использовании бесклеточной системы экспрессии синтез белка проводят с изотопно-меченными аминокислотами. Прогресс в области создания высокопольных ЯМР-спектрометров позволил увеличить максимально допустимый размер белков, структуру которых можно разрешить. Так, ЯМР-прибор с частотой 800 МГц способен определить трехмерную структуру белка массой 50 кД, меченного по трем изотопам.

Центры структурной геномики в мире

Исследования структурной геномики предполагают такую масштабность, что для решения задач, встающих перед учеными, необходимо объединение усилий множества исследовательских групп. Усилия по разработке инновационных процессов направлены на решение следующих задач:

- увеличение общего выхода белка в ходе экспрессии путем оптимизации протоколов клеточного роста и индукции;
- увеличение эффективности клеточного лизиса;
- увеличение стабильности мРНК, в том числе путем ингибирования клеточных РНКаз;
- увеличение эффективности солиubilизации детергентами;
- увеличение эффективности протеолитического удаления аффинных меток;
- минимизация протеолитического повреждения целевого белка эндогенными протеазами;
- разработка протоколов получения высококонцентрированных растворов белков с низкими концентрациями детергентов;
- уменьшение числа стадий очистки;
- изучение влияния добавок — липидов, ингибиторов — на стабильность очищенных белков.

Далее представлены сведения о некоторых коллективах и консорциумах ученых, занимающихся исследованиями в области структурной геномики.

Институт Пауля Шерера (Paul Scherrer Institut, Швейцария). В институте создана Технологическая платформа для высокопроизводительного клонирования и экспрессии (High Throughput Cloning and Protein Expression Technology Platform [35]), исследователи которой занимаются автоматизированным клонированием, синтезом и кристаллизацией белков для рентгеноструктурного анализа. Основ-

ным объектом этой лаборатории были растворимые белки цитоплазмы, и совсем недавно начались попытки автоматизированного выделения мембранных белков.

В институте также есть подразделение мембранных белков. Оно состоит из трех групп:

— группа мембранных белков занимается получением кристаллов белков с целью детального изучения их функций. В качестве объектов исследования выбраны аммиачные каналы семейства Mep/Amt/Rh, ионные каналы (регулируемые лигандами и напряжением) и межмембранные протеазы;

— группа рецепторов клеточной поверхности [28]. Занимается нейропептидами, в том числе получением кристаллов;

— группа бионанотехнологии [38] занимается созданием нанопористых матриц в качестве подложки для липидного бислоя, в котором растворены мембранные белки. Есть предположение, что липидный бислой на такой подложке будет стабилен и достаточно подвижен.

Национальный институт здоровья США ведет крупную исследовательскую программу по широкомасштабному определению структуры белков, объединяющую множество организаций — Protein Structure Initiative [29].

На первой стадии PSI (в 2000—2005 гг.) было получено 1100 белковых структур. В 2005 г. стартовала вторая фаза этих исследований. На базе автоматизированных систем экспрессии и кристаллизации белков планировалось за 5 лет получить более 4000 белковых структур. К августу 2008 г. было получено более 2000 структур.

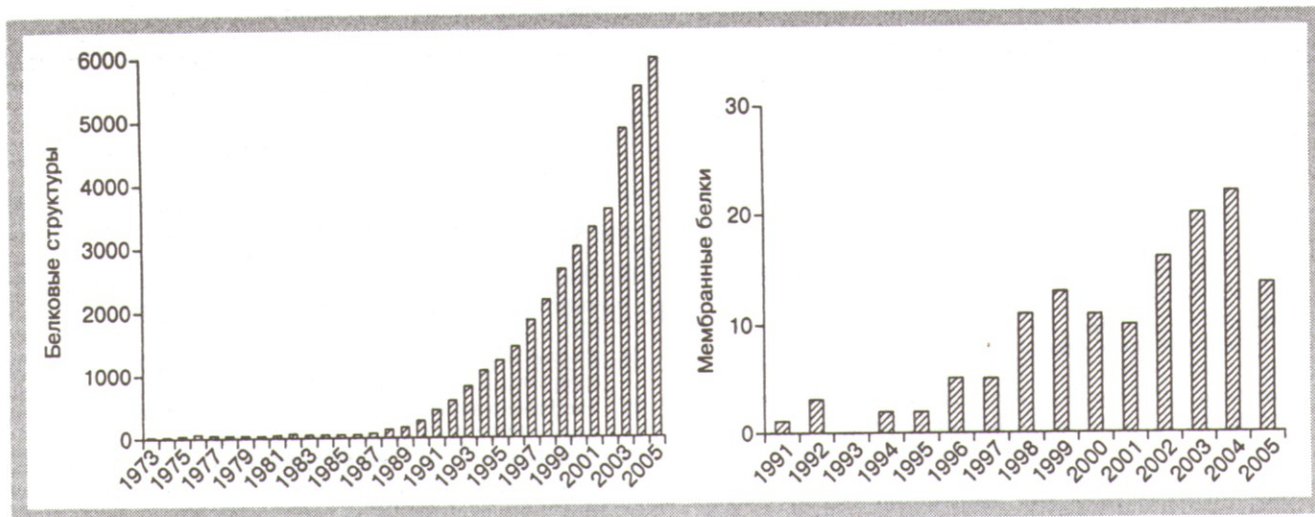
В состав исполнителей программы входят 4 крупномасштабных центра, 6 специализированных центров, в том числе 2 из них занимаются мембранными белками (см. ниже), 2 центра моделирования, 2 центра по объединению всей исследовательской деятельности.

В одной из организаций — Объединенном центре структурной геномики (Joint Center For Structural Genomics — JCSG) [15] существует автоматизированная система экспрессии, очистки и кристаллизации белков.

В других центрах, таких как Центр структур мембранных белков (The Center for Structures of Membrane Proteins — CSMP) [7], делается акцент на автоматизации только кристаллизации, в том числе на автоматическом распознавании хороших кристаллов.

Также в нескольких центрах занимаются наиболее сложными для экспрессии и кристаллизации мембранными белками — трансмембранными белками.

Оксфордский комплекс производства белков (Oxford Protein Production Facility — OPPF) [25]. Здесь разработана автоматизированная линия получения структур белков, начиная от клонирования и заканчивая кристаллизацией. Центр является партнером европейской программы SPINE—Structural Proteomics in Europe [36], которая объединила в 2003 г. 20 организаций и поставила целью за первый год добиться получения 50 белковых структур, а к третьему — 500. Было получено 308 новых структур и 61 производная.



Рост числа структур в PDB [13].

В 2006 г. началась программа SPINE2-Complexes [34], которая использует наработанные за время реализации SPINE методики для создания высокопроизводительных систем экспрессии и кристаллизации белков. Об актуальности этих исследований на сайте SPINE2 говорится, что разрешение трехмерных структур белков и белковых комплексов и появление новой структурной информации играют огромную роль в ускорении разработки новых лекарств и биотехнологических продуктов. Это в свою очередь стимулирует европейские промышленные и биотехнологические компании, позволяя им конкурировать с американскими и японскими коллегами. Разработка новых лекарств и биотехнологических продуктов позволит в будущем поднять уровень здоровья и качество жизни в Европе.

В мире существует еще несколько объединенных проектов, занимающихся исключительно структурной геномикой мембранных белков.

Европейский консорциум мембранных белков E-MeP (The European Membrane Protein Consortium) [11] состоит из 18 групп-участников.

В качестве цели в 2004 г. были выбраны 300 мембранных белков — 100 из прокариот, 200 из эукариот. Планировалось получать их в 6 различных системах экспрессии, 100 белков солиubilизировать, очистить 50 и разрешить трехмерную структуру для 20.

К августу 2008 г. получено 172 белка, солиubilизировано 64, очищено 52, закристаллизовано 22, структура разрешена для 5 белков. Везде, где возможно, применяются высокопроизводительные автоматизированные технологии.

Международная программа MePNet (Membrane Protein Network) [24] — исследовательский консорциум, основанный крупными фармацевтическими компаниями и биотехнологическими стартапами. Исследования ограничены только рецепторами, сопряженными с G-белками. С 2005 г. удалось получить 7 белков в количествах, достаточных для кристаллизации. Еще 20–30 белков планируется получить после оптимизации условий экспрессии.

Заключение

Исследования в области структурной геномики требуют координации усилий множества научных групп и использования самого современного оборудования как для решения специфических задач, так и для автоматизации лабораторной деятельности. Особенная ситуация сложилась в области мембранных белков. В настоящий момент динамика роста числа структур мембранных белков в PDB напоминает ситуацию с растворимыми белками в 70-х годах прошлого века (см. рисунок).

Возможно, мы находимся в начале резкого роста количества белков, для которых будет определена трехмерная структура. Как в 70-х годах разработка новых методов и создание новых приборов привели к экспоненциальному росту числа определения структур растворимых белков, так и сейчас то же самое может произойти в отношении мембранных белков.

Для того чтобы Россия не осталась в стороне от этого процесса, необходимо создание в стране исследовательских центров, которые в тесном взаимодействии друг с другом будут осуществлять исследования в области структурной геномики мембранных белков, с тем чтобы поставлять научному сообществу информацию о строении активных центров белков. Это, в частности, позволит перейти к созданию лекарств нового поколения на рациональной основе, а наличие наработанных рекомбинантных белков или методик их создания облегчит тестирование лигандов — кандидатов в лекарства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. Что за геномикой? — Протеомика // Вопр. мед. химии. — 2000. — Т. 46, № 4. — С. 335–343.
2. Арчаков А. Геномика, протеомика и биоинформатика — науки XXI столетия // Мед. кафедра. — 2002. — № 3. — С. 6.
3. Геннис Р. Биомембраны: молекулярная структура и функции. — М., 1997.

4. *Abola E., Kuhn P., Earnest T., Stevens R. C.* Automation of x-ray crystallography // *Nat. Struct. Biol.* — 2000. — Vol. 7. — Suppl. — P. 973–977.
5. *Akermoun M., Koglin M., Zvalova-Iooss D., Folschweiller N.* Characterization of 16 human G-protein-coupled receptors expressed in baculovirus-infected insect cells // *Protein Expr. Purif.* — 2005. — Vol. 44. — P. 65–74.
6. *Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G.* The protein data bank // *Nucl. Acids Res.* — 2000. — Vol. 28. — P. 235–242.
7. Center for structures of membrane proteins. <http://csm.ucsf.edu/index.htm>.
8. *Cereghino J. L., Cregg J. M.* Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2000. — Vol. 24. — P. 45–66.
9. *Chandonia J., Brenner S. E.* The impact of structural genomics: expectations and outcomes // *Science.* — 2006. — Vol. 311. — P. 347–351.
10. *Dove A.* Seeking purity in the proteomic era // *Genom. Proteom.* — 2004. — Vol. 4. — P. 20–24.
11. The European membrane protein consortium. <http://www.emep.org/index.php>.
12. *Gao F. P., Cross T. A.* Recent developments in membrane-protein structural genomics // *Genome Biol.* — 2005. — Vol. 6. — P. 244.
13. *Grisshammer R.* Understanding recombinant expression of membrane proteins // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2006. — Vol. 17. — P. 337–340.
14. *Hassaine G., Wagner R., Kempf J., Cherouati N.* Semliki forest virus vectors for overexpression of 101 G-protein-coupled receptors in mammalian host cells // *Protein Expr. Purif.* — 2006. — Vol. 45. — P. 343–351.
15. Joint center for structural genomics. <http://www.jcsg.org/>.
16. *Katzen F., Chang G., Kudlicki W.* The past, present and future of cell-free protein synthesis // *Trends Biotechnol.* — 2005. — Vol. 23. — P. 150–156.
17. *Katzen F.* Cell-free protein expression of membrane proteins using nanolipoprotein particles // *BioTechniques.* — 2008. — Vol. 45. — P. 190.
18. *Kiefer H., Maier K., Vogel R.* Refolding of G-protein-coupled receptors from inclusion bodies produced in *Escherichia coli* // *Biochem. Soc. Trans.* — 1999. — Vol. 27. — P. 908–912.
19. *Klammt C., Schwarz D., Löhr F., Schneider B.* Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein // *FEBS J.* — 2006. — Vol. 273. — P. 4141–4153.
20. *Luckow V. A.* Baculovirus systems for the expression of human gene products // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 1993. — Vol. 4. — P. 564–572.
21. *Lundstrom K.* Structural genomics on membrane proteins. — London, CRC Press, 2006.
22. *Lundstrom K., Wagner R., Reinhart C., Desmyter A.* Structural genomics on membrane proteins: comparison of more than 100 GPCRs in 3 expression systems // *J. Struct. Funct. Genom.* — 2006. — Vol. 7. — P. 77–91.
23. *Lundstrom K.* Structural genomics and drug discovery // *J. Cell. Mol. Med.* — 2007. — Vol. 11. — P. 224–238.
24. Membrane Proteins Network. <http://www.mepnet.org/>.
25. The Oxford protein production facility. <http://www.oppf.ox.ac.uk/OPPF/>.
26. *Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C. A.* Crystal structure of rhodopsin: a G-protein-coupled receptor // *Science.* — 2000. — Vol. 289. — P. 739–745.
27. *Powers R.* Applications of NMR to structure-based drug design in structural genomics // *J. Struct. Funct. Genom.* — 2002. — Vol. 2. — P. 113–123.
28. *Prota A.* et al. Structure-function studies of neuropilin signaling complexes. <http://sb.web.psi.ch/projects/neuropilin.html>.
29. The Protein structure initiative. <http://www.nigms.nih.gov/Initiatives/PSI.htm>.
30. *Rasmussen S. G. F., Choi H., Rosenbaum D. M., Kobilka T. S.* Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor // *Nature.* — 2007. — Vol. 450. — P. 383–387.
31. *Riggs P., La Vallie E. R., McCoy J. M.* Introduction to expression by fusion protein vectors // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* — 2001. — Vol. 16. — P. 16.4A.
32. *Rosser M. P., Xia W., Hartsell S., McCaman M.* Transient transfection of CHO-K1-s using serum-free medium in suspension: a rapid mammalian protein expression system // *Protein Expr. Purif.* — 2005. — Vol. 40. — P. 237–243.
33. *Shuker S. B., Hajduk P. J., Meadows R. P., Fesik S. W.* Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR // *Science.* — 1996. — Vol. 274. — P. 1531–1534.
34. SPINE2-Complexes. <http://www.spine2.eu>.
35. *Steinmetz M. O.* High throughput cloning and protein expression technology platform. <http://sb.web.psi.ch/HTP/HTP.html>.
36. Structural Proteomics in Europe. <http://www.spineurope.org>.
37. *Tickle I., Sharff A., Vinkovic M., Yon J.* High-throughput protein crystallography and drug discovery // *Chem. Soc. Rev.* — 2004. — Vol. 33. — P. 558–565.
38. *Tiefenauer L. X.* Functional assays for membrane proteins using nanostructured material. <http://sb.web.psi.ch/projects/bionanotechnology.html>.
39. *Villoutreix B. O., Renault N., Lagorce D., Sperandio O.* Free resources to assist structurebased virtual ligand screening experiments // *Curr. Protein Pept. Sci.* — 2007. — Vol. 8. — P. 381–411.
40. *Warne T., Serrano-Vega M. J., Baker J. G., Moukhametjanov R.* Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor // *Nature.* — 2008. — Vol. 454. — P. 486–491.
41. *Weigelt J., McBroom-Cerajewski L. D. B., Schapira M., Zhao Y.* Structural genomics and drug discovery: all in the family // *Curr. Opin. Chem. Biol.* — 2008. — Vol. 12. — P. 32–39.

Поступила 10.10.08