

SOUČASNÝ VÝVOJ V PROTEOMICE

MICHAELA COLLINSOVÁ, JIŘÍ JIRÁČEK

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 16610 Praha 6
jiracek@uochb.cas.cz

Došlo 19.3.04, přijato 8.10.04.

Klíčová slova: proteomika, proteom, 2-D elektroforéza, hmotnostní spektrometrie

Obsah

1. Co to je proteomika?
2. Metody proteomiky
 - 2.1. Metody založené na dvoudimenzionální gelové elektroforéze (2-DE)
 - 2.1.1. Identifikace proteinů z 2-D gelů
 - 2.2. Metody nevyužívající 2-DE
 - 2.2.1. Proteinové čipy
3. Aplikace proteomiky
4. Zpracování proteomických dat
5. Závěr

1. Co to je proteomika?

Díky obrovskému rozkvětu molekulární biologie během posledních deseti let se podařilo rozluštit genomy řady organismů, mezi jinými též genomy modelových živočichů, jako jsou např. muška octomilka *Drosophila melanogaster*¹, nebo hlíst *Caenorhabditis elegans*². První rostlinou, pro niž byla stanovena sekvence celého genomu, je *Arabidopsis thaliana*³. První nástin sekvence lidského genomu byl publikován na počátku roku 2001 (cit.⁴). V dubnu 2003 bylo u příležitosti 50. výročí objevení dvoušroubovice DNA oznámeno dokončení sekvenace lidského genomu (Human Genome Project, http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/project/50yr.shtml, cit.⁵). Současné biologické a biochemické vědy by měly směřovat své další úsilí k vysvětlení a pochopení funkce genů. Genetická informace je v organismu vyjádřena ve formě proteinů. Proteiny jsou skutečnými funkčními molekulami. Proto se proteiny opět dostaly do středu zájmu a vznikl nový obor proteomika (proteomics). Proteomiku lze definovat jako kvantitativní analýzu proteinů přítomných v organismu v určitém okamžiku a za přesně definovaných podmínek⁶. Termín „proteom“ byl poprvé použit v roce 1994 jako vyjádření proteinového ekvivalentu genomu⁶. Proteom představuje sadu všech proteinů,

kteří jsou genomem v průběhu života buňky exprimovány a následně modifikovány. Termín se rovněž používá v méně obecném smyslu pro vyjádření proteinového složení organismu, orgánu, tkáně nebo tělesné tekutiny v určitém okamžiku a za přesně definovaných podmínek. Protože proteom odráží aktuální metabolický stav dané buňky nebo organismu, představuje vysoce dynamický systém, který je charakteristicky ovlivňován změnami podmínek v okolním prostředí^{7,8}.

Proteomika může nepochybně výrazně přispět k porozumění funkcí genů. Ovšem „pouhá“ znalost kompletní sekvence genomu není pro objasnění biologických funkcí dostatečná, jelikož poskytuje pouze relativně statický přehled o funkčním potenciálu organismu a neumožňuje pohled na celkovou podobu proteinové exprese v prostoru a čase. Proteomika se zaměřuje přímo na genové produkty, a proto mohou být zjištěny i modifikace proteinů, které nejsou zřejmé ze sekvence nukleotidů v DNA. Jedná se např. o isoformy, post-translační modifikace nebo interakce protein-protein⁹.

Přeměna genetické informace do formy proteinů probíhá jak během různých vývojových fází organismu, tak v buňkách různých typů, a za různých podmínek daných okolním prostředím. Proteinová exprese je precizně regulována na všech svých úrovních, počínaje transkripcí, přes translaci až po post-translační modifikace. Hladiny DNA, mRNA a proteinů si však zpravidla vzájemně neodpovídají⁶. To znamená, že pro hlubší porozumění biologii organismů je zapotřebí propojit informace získané analýzami DNA, mRNA, proteinů a poznatky o jejich metabolismu⁹⁻¹¹.

Znalost lidského proteomu bezpochyby nalezne široké spektrum praktického využití v biologických i lékařských aplikacích. Biologické tekutiny, jako jsou krevní plasma, moč, sliny a další exkreta a sekreta, obsahují proteiny, což jsou z fyziologického a diagnostického hlediska velmi významné molekuly. Jejich přímá analýza a charakterizace v tělních tekutinách jsou proto důležité⁹⁻¹¹. Proteiny jakožto funkční molekuly představují zároveň vhodné farmaceutické cíle. Proteomika se tak přímo podílí na vývoji nových léků¹⁰.

Cesta k rozluštění lidského proteomu bude nicméně ještě dlouhá a namáhavá, protože je třeba charakterizovat každý protein kódovaný lidským genomem a porozumět jeho funkci, struktuře, molekulárním interakcím a regulacím v různých typech buňek a za různých fyziologických podmínek.

Proteomiku lze podle aplikací rozdělit do tří hlavních oblastí¹⁰. První je mikrocharakterizace proteinů, která se využívá pro identifikaci proteinů a pro studium jejich post-translačních modifikací. Mikrocharakterizace proteinů nám pomáhá zjistit, jaká je aktivní a funkční forma, ve které se proteiny vyskytují v organismu. Druhou oblastí je tzv. srovnávací proteomika (differential display proteo-

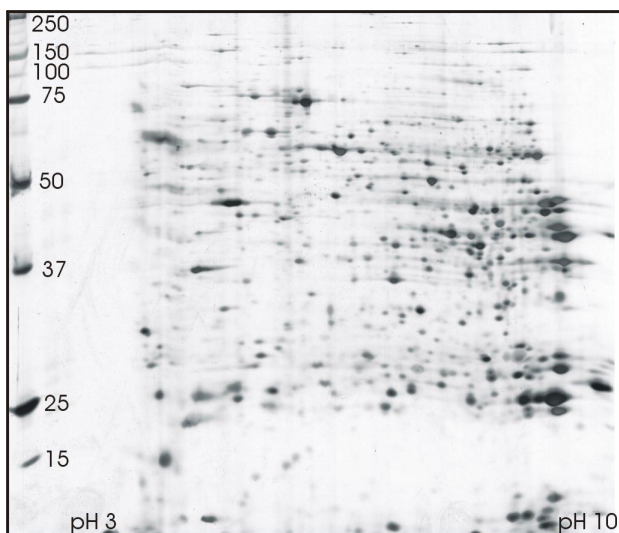
mics), zabývající se porovnáváním hladin proteinů. Tato technika je velmi důležitá a používána pro studium rozdílných stavů organismu, např. patologických či normálních, a pro vyhledávání proteinů, jejichž výskyt či hladina daný stav charakterizují. Výsledky srovnávací proteomiky mohou být využitelné při diagnostice a léčbě řady nemocí. Poslední oblastí je studium interakcí typu protein-protein technikami, jakými je např. hmotová spektrometrie. Sledování interakcí typu protein-protein může sloužit např. k identifikaci multienzymových komplexů či k hledání substrátu a ligandů pro enzymy a receptory.

2. Metody proteomiky

Proteomika je založena na metodách analýzy proteinů ve velmi komplexních směsích. V následujících kapitolách se pokusíme tyto metody podrobněji popsat.

2.1. Metody založené na dvoudimenzionální gelové elektroforéze (2-DE)

Nejvyužívanější metoda při proteomické analýze nejčastěji kombinuje vysokouúčinnou dvoudimenzionální gelovou elektroforézu (2-DE) sloužící k separaci proteinů s hmotovou spektrometrií (MS) používanou k identifikaci vybraných proteinových skvrn z gelů. Pomocí 2-DE lze rozdělit v ideálních případech až několik tisíc proteinů. Teoreticky může být na jediném 2-DE gelu rozlišeno až 10 000 skvrn^{9,12}. Příklad 2-D elektroforetické analýzy homogenátu z myších jater⁶⁸ je ilustrován na obr. 1.



Obr. 1. 2-D elektroforetická analýza homogenátu z myších jater. Bylo aplikováno 50 μ g proteinů. Pro první rozměr byl použit 17 cm „non-linear IPG strip“ o rozmezí pH 3-10 (zleva doprava). Druhý rozměr byl realizován v gradientovém (8-16% shora dolů) polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného. V levé části gelu jsou vidět proteinové standardy (15-250 kDa) analyzované pouze v druhém rozměru⁶⁸

Přestože 2-DE je velmi vhodnou metodou pro separaci komplexních směsí proteinů, má tato technika i svoje nevýhody. Jednou z nich je problém širokého rozpětí koncentrací jednotlivých přítomných proteinů. V případě lidských buněk představuje toto rozpětí přibližně 7 řádů, od nejmenšího výskytu (1 kopie) po nejhojnější (10⁶ kopií) zastoupení proteinů přítomných v buňce ve stejném okamžiku¹³. Používané metody barvení proteinů v gelech, včetně fluorescenčního zobrazování, však vizualizují pouze ty proteiny, které ve vzorku vykazují střední až vysokou míru výskytu^{13,14}. Ačkoliv technický pokrok v oblasti 2-DE a MS proteinů zvýšil citlivost, reprodukovatelnost a kapacitu proteomické analýzy, není možné analyzovat tak široké rozpětí výskytu proteinů současně. Další nevýhodou 2-DE je její časová náročnost a pracnost celého procesu, který vyžaduje specifické dovednosti a zručnost pro tvorbu kvantitativně a prostorově reprodukovatelných gelů^{15,16}.

Problém detekce a identifikace proteinů vyskytujících se v buňce v nízkých koncentracích může být částečně vyřešen předčištěním komplexních proteinových směsí. Pre-fractions zvyšuje množství proteinů málo zastoupených vzhledem k ostatním proteinům. Nejjednodušší je frakcionace na jednotlivé orgány. Směsi proteinů mohou být dále frakcionovány podle náboje. To je možné přímo během isoelektrické fokusace při použití pH gradientů o úzkém rozpětí. V takovém případě je analýza rozdělena do sady překrývajících se gelů. Další možnosti použití elektroforetických technik pro pre-fractions proteinových vzorků podává ve svém přehledu Righetti¹⁷. Pro odstranění nežádoucích proteinů se rovněž používají afinitní techniky, které umožňují odstranění specifických skupin proteinů. Afinitní techniky jsou velmi užitečné pro odstranění proteinů, které se vyskytují ve vysoké koncentraci, jako je např. albumin z krevního séra nebo plasmy¹⁸. Afinitním předčištěním můžeme ale také dosáhnout obohacení vzorku o specifické typy žádaných proteinů. Např. použitím afinitního nosiče s konkanavalinem A obohatíme vzorek o glykosylované proteiny^{18,19}.

Rabilloud²⁰ a Herbert a spol.²¹ zdokonalili techniky přípravy vzorku pro 2-DE za účelem zvýšení rozpustnosti proteinů v průběhu isoelektrické fokusace (IEF), a tím i ke zvýšení rozlišení a kapacity výsledných dvoudimenzionálních gelů. Molloyova metoda²² postupné extrakce je založena na odlišné rozpustnosti proteinů, kdy se v každém následujícím extrakčním kroku používá silnější solubilizující činidlo. Tímto způsobem je složitá proteinová směs rozdělena do několika 2-DE gelů. Všechna tato zdokonalení přispívají ke zvýšení relativního zastoupení hydrofobních proteinů ve výsledných 2-DE gelech. Tato skutečnost je žádoucí vzhledem k tomu, že hydrofobní membránové proteiny hrají významnou roli v buněčných procesech, jako např. při přenosu signálů v buňce nebo při membránovém transportu, a patří rovněž mezi významné cíle terapeutických látek. Membránové proteiny se na 2-DE gelu těžko vizualizují, protože se většinou vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, mají pI v alkalické oblasti a jsou velmi špatně rozpustné ve vodných rozpouštědlech²³. Je-

jich lepšímu rozlišení na výsledných gelech může napomoci přidavek trifluorethanolu do solubilizačního činidla²⁴. V roce 1988 byly zavedeny tzv. imobilizované pH gradienty²⁵ pro isoelektrickou fokusaci a jejich rychlý vývoj během několika posledních let umožnil tvorbu pH gradientů až do pH 12, což usnadňuje separaci velmi bazických proteinů²⁶.

2.1.1. Identifikace proteinů z 2-D gelů

V počátcích proteomiky sloužila k identifikaci mikroanalytických množství proteinů separovaných pomocí 2-DE sekvenace *N*-terminálních aminokyselin, tzn. Edmanovo odbourávání²⁷. Tato metoda je ovšem neúčinná v případě blokovaného *N*-konce proteinů. Dnes je Edmanovo odbourávání nahrazeno citlivější a výkonnější hmotovou spektrometrií (MS), která spolu s 2-DE vytvořila integrovanou technologii^{9,28}. Elektroforeticky separované a v gelu obarvené proteiny mohou být z gelu roboticky vyříznuty a poté štěpeny specifickou proteasou, např. trypsinem. Výsledné peptidy jsou pak identifikovány hmotnostní spektrometrií technikou MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization) nebo ESI (elektrospray ionization). Signály peptidů a jejich fragmentů mohou být určeny s takovou přesností, že porovnání píků určitého peptidu a jeho fragmentace s databázemi (např. ProFound nebo Mascot) může vést k identifikaci proteinu včetně jeho modifikací⁹. V této fázi proteomický výzkum těži z genomického výzkumu poslední dekády, díky němuž jsou nyní k dispozici archivované a anotované databáze sekvencí proteinů nejrůznějších organismů. Tyto databáze poskytují výtečný podklad pro křížovou korelaci transkriptomických (transkriptomika je obor, který se zabývá studiem rozsahu a regulace přepisu genů do mRNA) a proteomických dat.

2.2. Metody nevyužívající 2-DE

Vedle přístupu kombinujícího 2-DE s hmotnostní spektrometrií, pomocí něhož nelze detegovat, identifikovat a kvantifikovat všechny proteiny přítomné ve vzorku²⁹, se objevují nové, na gelové elektroforéze nezávislé přístupy. Technologie multidimenzionální proteinové identifikace (MudPIT – multidimensional protein identification technology), která byla prvně použita v Yatesově laboratoři³⁰, je založena na multidimenzionální kapalinové chromatografii a tandemové hmotové spektrometrii. Analýzou celého proteomu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* touto metodou bylo detegováno a identifikováno téměř 1500 proteinů (tj. 5× více než při použití 2-DE gelu), včetně proteinů přítomných v nízké koncentraci, membránových proteinů a rovněž proteinů velmi bazických a proteinů o vysoké molekulové hmotnosti³¹. Tato technologie dokáže detegovat a identifikovat proteiny v rámci dynamického rozpětí výskytu čtyř řádů včetně proteinů, které se vyskytují jen vzácně^{32,33}.

Jiný přístup, který je založený na hmotnostní spektrometrii, využívá izotopem kódované afinitní značky (ICAT – isotope coded affinity tags), které reagují se sulfhydrylo-

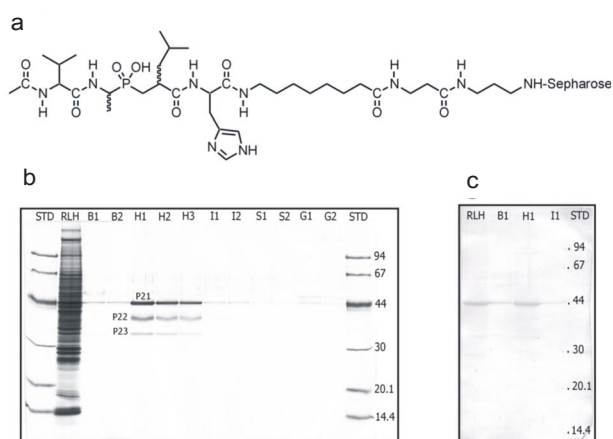
vými skupinami proteinů a obsahují raménko, které může být deuterované, a biotinovou značku. Cysteinové zbytky jsou derivatizovány pomocí „lehkých“ nebo „těžkých“ (deuterovaných) ICAT činidel. Vzorky jsou poté spojeny a štěpeny proteasou. Biotinem značené peptidy jsou následně izolovány afinitní chromatografií a identifikovány a kvantifikovány kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií. Každý peptid se v hmotnostním spektru objevuje jako dublet s rozdílem hmotnosti rovnajícím se počtu atomů deuteria. Relativní zastoupení daného proteinu v obou vzorcích je určeno poměrem píků této dvojice³⁴.

2.2.1. Proteinové čipy

Snaha vyvinout metody pro analýzu genové exprese, které by byly nezávislé na procesu separace, vyústila ve vývoj proteinových čipů („protein arrays“) podobných DNA čipům („DNA arrays“). Proteinové čipy jako alternativa k běžným proteomickým přístupům se zdají být novou, nadějnou a vysoce kapacitní technikou pro studium proteomu³⁵. Specifické proteiny, jako jsou např. protilátky schopné rozpoznávat a vázat jiné proteiny, mohou být imobilizovány na čipy se speciálně upravenými povrchy. Na povrch čipů s imobilizovanými protilátkami je poté aplikován vybraný proteinový vzorek. Na čipy zůstanou navázány pouze proteiny, které se vážou na odpovídající protilátku¹⁰. Zachycené proteiny mohou být detegovány přímo na čipu hmotnostní spektrometrií. Přístup propojující proteinové čipy s identifikací hmotovou spektrometrií je nazýván „surface-enhanced laser desorption/ionization“ (SELDI-MS) a byl zdokonalen firmou Ciphergen, která stála u zrodu proteinových čipů^{9,36}.

Na základě možností své aplikace rozeznáváme dva druhy proteinových čipů³⁷. Prvním jsou čipy sloužící ke studiu funkce proteinů (protein function arrays), kdy jsou na čipech imobilizovány proteiny. Tyto čipy se mohou používat pro paralelní studie aktivity nativních proteinů nebo pro studium interakcí protein-protein^{38,39}. Druhý typ čipů, tzv. čipy detegující proteiny (protein-detecting arrays) s navázanými specifickými proteinovými ligandy, může sloužit jako analytický nástroj pro monitorování hladin proteinů v biologických vzorcích³⁷ či pro identifikaci nových proteinových cílů pro chemicky připravené ligandy.

K aplikacím druhého typu (čipy detegující proteiny) patří i naše nedávno publikovaná práce⁴⁰, kdy jsme připravili kombinatorickou knihovnu pseudopeptidů-fosfinátů imobilizovaných na pryskyřici. Knihovna byla připravena ve formě devatenácti směsí, z nichž každá obsahovala 19 imobilizovaných pseudopeptidů. Tyto nosiče byly použity jako afinitní kolony pro purifikaci enzymů z homogenátu z potkaních jater. Řada studií prokázala, že pseudopeptidy-fosfináty mohou být velmi účinnými inhibitory celé řady enzymů, zejména Zn-metaloenzymů^{41,42}. V našem případě⁴⁰ se podařilo za pomoci afinitních kolon s imobilizovanými pseudopeptidy-fosfináty izolovat potkaní Zn-metaloenzym betain-homocystein S-methyltransferasu (BHMT). Pseudopeptidy, které v imobilizova-



Obr. 2a. **Struktura afinitní matrice použitá pro izolaci potkaní jaterní betain-homocystein S-methyltransferasy (BHMT).** Obr. 2b. **Elektroforetická analýza frakcí získaných z afinitního nosiče zobrazeného na obrázku (a).** RLH je homogenát z potkaních jater. Frakce B1-B2 byly eluovány betainem, frakce H1-H3 DL-homocysteinem, frakce I1-I2 roztokem inhibitoru, frakce S1-S2 roztokem 1% dodecylsulfátu sodného a frakce G1-G2 roztokem 6M guanidinium chloridu. Relativní molekulové váhy standardů (STD) jsou znázorněny v kDa. Protein P21 je potkaní BHMT, protein P22 je příbuzný enzym BHMT 2 a protein P23 je fragment BHMT. Obr. 2c. **„Western blot analýza“ vybraných frakcí z afinitní purifikace potkaní BHMT za použití polyklonálních protilátek proti lidské BHMT.** Převzato z lit.⁴⁰

né formě posloužily k izolaci BHMT, byly poté testovány v roztoku za účelem zjištění jejich inhibičních vlastností vůči tomuto enzymu. Nejsilnější inhibitor byl poté sám imobilizován na nosiči. Pomocí této jednoduché afinitní kolony (obr. 2a) se podařilo v jednom kroku izolovat vysoce čistou potkaní BHMT a její homology a degradační produkty (obr. 2b). Tyto výsledky demonstrují, že novým proteomickým přístupem založeným na spojení kombinatorické chemie a afinitní chromatografie je možné identifikovat, bez jakékoli *a priori* hypotézy, nové proteinové cíle pro chemicky připravené zajímavé ligandy.

3. Aplikace proteomiky

Biologická aktivita proteinu často závisí na tom, zda je protein modifikován a jakým způsobem (např. fosforylovaný/defosforylovaný či glykosylovaný/deglykosylovaný). Právě schopnost analyzovat post-translační modifikace proteinů je jedním z výrazných přínosů proteomických studií. Fosforylace, glykosylace, stejně jako ostatní modifikace, jsou pro funkci proteinu nesmírně důležité, protože určují jeho aktivitu, stabilitu, lokalizaci či rychlost odbourávání. Nejvhodnější metodou pro určení modifikací proteinů je hmotnostní spektrometrie. Jde ovšem o úkol mnohem obtížnější než je pouhé určení identity proteinu. Např. purifikací peptidové směsi na koloně s pryskyřicí obsahující navázaný kov (IMAC – metal ion affinity chro-

matography) je možné obohatit vzorek o fosfopeptidy⁴³. Peptidy mohou být pak analyzovány metodou MALDI-MS jak před, tak po aplikaci alkalické fosfatasy¹⁰.

Jednou z klíčových otázek proteomiky, kromě toho kdy a kde jsou proteiny exprimovány, je otázka vzájemných interakcí mezi proteiny. Partneři, se kterými daný protein vstupuje do interakcí, jsou okamžitými vodítky k jeho biologickým funkcím a potencionálně mohou být využity pro terapeutické účely. Proteomika může ke studiu interakcí protein-protein významně přispět^{30,44}. Lákavou nicméně obtížnou cestou ke studiu protein-proteinových interakcí je purifikace celého multi-proteinového komplexu afinitními metodami (fúzní proteiny, protilátky). Proteinový komplex je následně separován elektroforézou a analyzován hmotnostní spektrometrií^{10,39}.

Srovnávací proteomika je diferenciální analýza komplexních směsí proteinů, která monitoruje změny proteomického složení za různých stavů organismu, např. nemocný *versus* zdravý, léčený *versus* neléčený, normální *versus* patologický stav apod.^{45,46}. Cílem je identifikovat proteiny, které jsou syntetizovány ve vyšší či nižší míře, určit, zda některé proteiny chybějí, jsou modifikovány, případně zjistit výskyt proteinů nových. Proteomika tak může sloužit k vyhledávání specifických proteinů (tzv. „protein markers“) na základě jejich zvýšené nebo snížené exprese při onemocnění⁴⁷. Novou, velice slibnou metodou pro srovnávání dvou proteinových vzorků, např. ze zdravých a rakovinných buněk, je tzv. DIGE („differential in-gel electrophoresis“)^{65–67}. Při DIGE je každý ze vzorků derivatizován rozdílnou fluorescenční značkou. Derivatizované proteiny obou vzorků jsou poté spojeny a separovány na jednom a tom samém 2-D gelu. Tento jediný gel je poté analyzován při dvou rozdílných vlnových délkách. Je tak možné zjistit rozdíly v expresi jednoho a toho samého proteinu v obou vzorcích při eliminování problémů spojených s reprodukovatelností elektroforetických analýz. Nevýhodou této metody je její značná finanční náročnost.

Toxikologické studie často využívají proteomickou analýzu ke zjištění mechanismu, jakým lék působí, nebo k identifikaci cílového místa jeho působení⁴⁸. Práce Steinerja a spol.⁴⁹, který zkoumal vliv lovastatinu (látky snižující hladinu lipidů) na složení proteinů z krysích jater, ukazuje možnost, jak objevit nové proteomické cíle analýzou již známých léků a drah, které regulují.

Srovnávací proteomika se může rovněž provádět bez separace nebo jen s omezenou separací proteinů následovanou kvantifikací hmotovou spektrometrií. Toho je dosaženo např. označením jednoho ze dvou proteinových vzorků stabilním izotopem (ICAT, cit.¹⁰).

Proteomická analýza se využívá v celé řadě biomedicínských aplikací, počínaje analýzou mozkových proteinů nebo proteinů mozkomíšního moku a s nimi souvisejících onemocnění, jako je např. Alzheimerova choroba⁵⁰, až po analýzu chorob ledvin, močového mechýře a moči a souvisejících nemocí^{51–53} (<http://biobase.dk/cgi-bin/celisis>). Proteomika našla uplatnění také v lékařské mikrobiologii, jelikož může přispět k objasnění mechanismů patogenese nebo k porozumění mechanismu, jakým se vytváří antibi-

tická rezistence. Napomáhá tak zvýšení účinnosti současných antimikrobiálních léčiv⁵⁴.

Výzkum rakoviny je další oblastí, ve které může být proteomická technologie velmi přínosná. Řada proteinů vhodných pro diagnózu nádorů již byla objevena. Bude ovšem třeba identifikovat takové specifické proteiny, pomocí kterých bude možno rozlišovat maligní nádory od benigních a primární nádory a jejich metastázy. Ke správnému odhadu biologického chování různých nádorů a pro určení správných léčebných postupů je třeba kombinovat několik takových proteinů. Proteomika se také začíná uplatňovat při včasné diagnostice rakoviny⁵⁵ a rovněž může napomoci objasnit mechanismus její patogeneze⁵⁶.

4. Zpracování proteomických dat

Při proteomických studiích jsou získávána velká množství údajů, která musejí být logicky organizována, archivována a zpřístupněna. První databáze dvoudimenzionálních gelů proteinů z krysích jater byla publikována v roce 1991 Andersonem a spol.⁵⁷. Dnes jsou k dispozici proteomické databáze různých biologických druhů, které jsou pravidelně aktualizovány⁵⁸⁻⁶¹. Předběžné proteomické studie, které vytvořily dvoudimenzionální proteinové mapy různých organel⁶², orgánů nebo jejich částí⁶³, vytvářejí velmi užitečnou základnu pro budoucí studie mnoha různých procesů. Celis se spolupracovníky⁶⁴ vytvořil první detailní proteomickou mapu zahrnující nemocnou lidskou tkáň (<http://biobase.dk/cgi-bin/celis>). Tvorbu takových databází usnadňuje program pro analýzu 2D zobrazení, který umožňuje automatickou identifikaci rozdílů v proteomických vzorcích.

5. Závěr

Proteomika zaznamenala v několika posledních letech bouřlivý vývoj a poskytla obrovské množství dat o proteinovém složení specifických buněk, organel, rakovinných tkání či o interakcích protein-protein. Nicméně, pro rychlejší pokrok a naplnění všech možností proteomiky bude nutný další vývoj nových technologií, zejména čipových, organizování mezinárodních projektů a volný přístup k vědeckým výsledkům.

Práce byla podpořena grantem A4055302 Grantové agentury Akademie věd České republiky a výzkumným záměrem Z4 055 905.

LITERATURA

- Adams M. D., Celniker S. E., Holt R. A., Evans C. A., Gocayne J. D., Amanatides P. G., Scherer S. E., Li P. W., Hoskins R. A., Galle R. F., George R. A., Lewis S. E., Richards S., Ashburner M., Henderson S. N., Sutton G. G., Wortman J. R., Yandell M. D., Zhang Q., Chen L. X., Brandon R. C., Rogers Y. H. C., Blazej R. G., Champe M., Pfeiffer B. D., Wan K. H., Doyle C., Baxter E. G., Helt G., Nelson C. R., Miklos G. L. G., Abril J. F., Agbayani A., An H. J., Andrews-Pfannkoch C., Baldwin D., Ballew R. M., Basu A., Baxendale J., Bayraktaroglu L., Beasley E. M., Beeson K. Y., Benos P. V., Berman B. P., Bhandari D., Bolshakov S., Borkova D., Botchan M. R., Bouck J., Brokstein P., Brottier P., Burtis K. C., Busam D. A., Butler H., Cadieu E., Center A., Chandra I., Cherry J. M., Cawley S., Dahlke C., Davenport L. B., Davies A., de Pablos B., Delcher A., Deng Z. M., Mays A. D., Dew I., Dietz S. M., Dodson K., Doup L. E., Downes M., Dugan-Rocha S., Dunkov B. C., Dunn P., Durbin K. J., Evangelista C. C., Ferraz C., Ferriera S., Fleischmann W., Fosler C., Gabrielian A. E., Garg N. S., Gelbart W. M., Glasser K., Glodek A., Gong F. C., Gorrell J. H., Gu Z. P., Guan P., Harris M., Harris N. L., Harvey D., Heiman T. J., Hernandez J. R., Houck J., Hostin D., Houston D. A., Howland T. J., Wei M. H., Ibegwam C., Jalali M., Kalush F., Karpen G. H., Ke Z. X., Kennison J. A., Ketchum K. A., Kimmel B. E., Kodira C. D., Kraft C., Kravitz S., Kulp D., Lai Z. W., Lasko P., Lei Y. D., Levitsky A. A., Li J. Y., Li Z. Y., Liang Y., Lin X. Y., Liu X. J., Mattei B., McIntosh T. C., McLeod M. P., McPherson D., Merkulov G., Milshina N. V., Mobarry C., Morris J., Moshrefi A., Mount S. M., Moy M., Murphy B., Murphy L., Muzny D. M., Nelson D. L., Nelson D. R., Nelson K. A., Nixon K., Nusskern D. R., Pacleb J. M., Palazzolo M., Pittman G. S., Pan S., Pollard J., Puri V., Reese M. G., Reinert K., Remington K., Saunders R. D. C., Scheeler F., Shen H., Shue B. C., Siden-Kiamos I., Simpson M., Skupski M. P., Smith T., Spier E., Spradling A. C., Stapleton M., Strong R., Sun E., Svirskas R., Tector C., Turner R., Venter E., Wang A. H. H., Wang X., Wang Z. Y., Wassarman D. A., Weinstock G. M., Weissenbach J., Williams S. M., Woodage T., Worley K. C., Wu D., Yang S., Yao Q. A., Ye J., Yeh R. F., Zaveri J. S., Zhan M., Zhang G. G., Zhao Q., Zheng L. S., Zheng X. Q. H., Zhong F. N., Zhong W. Y., Zhou X. J., Zhu S. P., Zhu X. H., Smith H. O., Gibbs R. A., Myers E. W., Rubin G. M., Venter J. C.: *Science* 287, 2185 (2000).
- The *C. elegans* Sequencing Consortium: *Science* 282, 2012 (1998).
- The *Arabidopsis* Genome Initiative: *Nature* 408, 796 (2000).
- International Human Genome Sequencing Consortium: *Nature* 409, 860 (2001).
- Collins F. S., Morgan M., Patrinos A.: *Science* 300, 286 (2003).
- Lottspeich F.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38, 2476 (1999).
- Rao P. V., Garrow T. A., John F., Garland D., Millian N. S., Zigler J. S., Jr.: *J. Biol. Chem.* 273, 30669 (1998).

8. Abbott A.: *Nature* 402, 715 (1999).
9. Jenkins R. E., Pennington S. R.: *Proteomics* 1, 13 (2001).
10. Pandey A., Mann M.: *Nature* 405, 837 (2000).
11. Eisenberg D., Marcotte E. M., Xenarios I., Yeates T. O.: *Nature* 405, 823 (2000).
12. Klose J., Kobalz U.: *Electrophoresis* 16, 1034 (1995).
13. Corthals G. L., Wasinger V. C., Hochstrasser D. F., Sanchez J.-C.: *Electrophoresis* 21, 1104 (2000).
14. Anderson N. L., Anderson N. G.: *Electrophoresis* 19, 1853 (1998).
15. Görg A., Obermaier Ch., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W.: *Electrophoresis* 21, 1037 (2000).
16. Quadroni M., James P.: *Electrophoresis* 20, 664 (1999).
17. Righetti P. G., Castagna A., Herbert B., Reymond F., Rossier J. S.: *Proteomics* 3, 1397 (2003).
18. Lopez M. F.: *Electrophoresis* 21, 1082 (2000).
19. Lopez M. F., Kristal B. S., Chernokalskaya E., Lazarev A., Shestopalov A. I., Bogdanova A., Robinson M.: *Electrophoresis* 21, 3427 (2000).
20. Rabilloud T.: *Electrophoresis* 19, 758 (1998).
21. Herbert B. R., Molloy M. P., Gooley A. A., Walsh B. J., Bryson W. G., Williams K. L.: *Electrophoresis* 19, 845 (1998).
22. Molloy M. P., Herbert B. R., Walsh B. J., Tyler M. I., Traini M., Sanchez J.-C., Hochstrasser D. F., Williams K. L., Gooley A. A.: *Electrophoresis* 19, 837 (1998).
23. Santoni V., Molloy M., Rabilloud T.: *Electrophoresis* 21, 1054 (1999).
24. Deshusses J. M. P., Burgess J. A., Scherl A., Wenger Y., Walter N., Converset V., Paesano S., Corthals G. L., Hochstrasser D. F., Sanchez J.-C.: *Proteomics* 3, 1418 (2003).
25. Görg A., Postel W., Günther S.: *Electrophoresis* 9, 531 (1988).
26. Görg A., Obermaier Ch., Boguth G., Weiss W.: *Electrophoresis* 20, 712 (1999).
27. Aebersold R. H., Leavitt J., Saavedra R. A., Hood L. E., Kent S. B. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 6970 (1987).
28. Rabilloud T.: *Proteomics* 2, 3 (2002).
29. Gygi S. P., Corthals G. L., Zhang Y., Rochon Y., Aebersold R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9390 (2000).
30. Link A. J., Eng J., Schieltz D. M., Carmack E., Mize G. J., Morris D. R., Garvik B. M., Yates J. R. 3.: *Nat. Biotechnol.* 17, 676 (1999).
31. Washburn M. P., Wolters D., Yates J. R. 3.: *Nat. Biotechnol.* 19, 242 (2001).
32. Wolters D. A., Washburn M. P., Yates J. R. 3.: *Anal. Chemistry* 73, 5683 (2001).
33. Washburn M. P., Ulaszek R., Deciu C., Schieltz D. M., Yates J. R. 3.: *Anal. Chem.* 74, 1650 (2002).
34. Gygi S. P., Rist B., Gerber S. A., Turecek F., Gelb M. H., Aebersold R.: *Nat. Biotechnol.* 17, 994 (1999).
35. Templin M. F., Stoll D., Schwenk J. M., Potz O., Kramer S., Joos T. O.: *Proteomics* 3, 2155 (2003).
36. Wells W. A.: *Chem. Biol.* 6, R259-R260 (1999).
37. Kodadek T.: *Chem. Biol.* 8, 105 (2001).
38. MacBeath G., Schreiber S. L.: *Science* 289, 1760 (2000).
39. Cho S., Park S. G., Lee D. H., Park D. C.: *J. Biochem. Mol. Biol.* 37, 45 (2004).
40. Collinsová M., Castro C., Garrow T. A., Yiotakis A., Dive V., Jiráček J.: *Chem. Biol.* 10, 113 (2003).
41. Collinsová M., Jiráček J.: *Curr. Med. Chem.* 7, 629 (2000).
42. Dive V., Lucet-Levannier K., Georgiadis D., Cotton J., Vassiliou S., Cuniase P., Yiotakis A.: *Biochem. Soc. Trans.* 28, 455 (2000).
43. Nuhse T. S., Stensballe A., Jensen O. N., Peck S. C.: *Proteomics* 2, 1234 (2003).
44. Blackstock W. P., Weir M. P.: *Trends Biotechnol.* 17, 121 (1999).
45. Witzmann F. A., Carpenter R. L., Ritchie G. D., Wilson C. L., Nordholm A. F., Rossi III J.: *Electrophoresis* 21, 2138 (2000).
46. Krapfenbauer K., Berger M., Lubec G., Fountoulakis M.: *Electrophoresis* 22, 2086 (2001).
47. McKerrow J. H., Bhargava V., Hansell E., Huling S., Kuwahara T., Matley M., Coussens L., Warren R.: *Mol. Med.* 6, 450 (2000).
48. Eberini I., Agnello D., Miller I., Villa P., Fratelli M., Ghezzi P., Gemeiner M., Chan J., Aebersold R., Gianazza E.: *Electrophoresis* 21, 2170 (2000).
49. Steiner S., Gatlin C. L., Lennon J. J., McGrath A. M., Aponte A. M., Makusky A. J., Rohrs M. C., Anderson N. L.: *Electrophoresis* 21, 2129 (2000).
50. Rohlff Ch.: *Electrophoresis* 21, 1227 (2000).
51. Celis J. E., Celis P., Ostergaard M., Basse B., Lauridsen J. B., Ratz G., Rasmussen H. H., Orntoft T. F., Hein B., Wolf H., Celis A.: *Cancer Res.* 59, 3003 (1999).
52. Celis J. E., Wolf H., Ostergaard M.: *Electrophoresis* 21, 2115 (2000).
53. Spahr C. S., Davis M. T., McGinley M. D., Robinson J. H., Bures E. J., Beierle J., Mort J., Courchesne P. L., Chen K., Wahl R. C., Yu W., Luethy R., Patterson S. D.: *Proteomics* 1, 93 (2001).
54. Cash P.: *Electrophoresis* 21, 1187 (2000).
55. Wulfschlegel J. D., Liotta L. A., Petricoin E. F.: *Nat. Rev. Cancer* 3, 267 (2003).
56. Alaiya A. A., Franzén B., Auer G., Linder S.: *Electrophoresis* 21, 1210 (2000).
57. Anderson N. L., Esquer-Blasco R., Hofmann J.-P., Anderson N. G.: *Electrophoresis* 12, 907 (1991).
58. Fountoulakis M., Berndt P., Boelsterli U. A., Cramer F., Winter M., Albertini S., Suter L.: *Electrophoresis* 21, 2148 (2000).
59. Fountoulakis M., Juranville J.-F., Berndt P., Langen H., Suter L.: *Electrophoresis* 22, 1747 (2001).
60. Fountoulakis M., Berndt P., Langen H., Suter L.: *Electrophoresis* 23, 311 (2002).

61. Perrot M., Sagliocco F., Mini T., Monribot Ch., Schneider U., Schevchenko A., Mann M., Jenö P., Boucherie H.: *Electrophoresis* 20, 2280 (1999).
62. Jung E., Heller M., Sanchez J.-C., Hochstrasser D. F.: *Electrophoresis* 21, 3369 (2000).
63. Witzmann F. A., Fultz C. D., Grant R. A., Wright L. S., Kornguth S. E., Siegel F. L.: *Electrophoresis* 19, 2491 (1998).
64. Celis J. E., Ostergaard M., Jensen N. A., Gromova I., Rasmussen H. H., Gromov P.: *FEBS Lett.* 430, 64 (1998).
65. Unlu M., Morgan M. E., Minden J. S.: *Electrophoresis* 18, 2071 (1997).
66. Zhou G., Li H., DeCamp D., Chen S., Shu H., Gong Y., Flaig M., Gillespie J. W., Hu N., Taylor P. R., Emmert-Buck M. R., Liotta L. A., Petricoin III E. F., Zhao Y.: *Moll. Cell. Proteomics* 1, 117 (2002).
67. Knowles M. R., Cervino S., Skynner H. A., Hunt S. P., de Felipe C., Salim K., Meneses-Lorente G., McAllister G., Guest P. C.: *Proteomics* 3, 1162 (2003).
68. Collinsová M., Jiráček J.: nepublikované výsledky.

M. Collinsová and J. Jiráček (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Current Development in Proteomics**

Proteomics is a quantitative, large-scale analysis of proteins present in organism at a certain time and under certain conditions. This review summarizes recent developments in this new rapidly developing field of biochemistry.

*Vážení čtenáři,
dovolujeme si Vás upozornit, že další číslo věnované farmaceutické chemii vyjde
v lednu 2006.
Věříme, že tato problematika najde mezi čtenáři odezvu a že o příspěvky nebude,
stejně jako v letošním roce, nouze.*

redakce