

PROTEOMIKA JAKO KOMPLEXNÍ PŘÍSTUP KE STUDIU FYZIOLOGICKÝCH REGULACÍ U BAKTERIÍ

JAROSLAV WEISER, MARTIN HOLUB,
ŠÁRKA NEZBEDOVÁ a SILVIE BEZOUŠKOVÁ

*Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20
Praha 4
weiser@biomed.cas.cz*

Došlo 2.9.05, přijato 1.11.05.

Klíčová slova: proteomika, mikrobiologie, diferenciace, antibiotika, streptomycety, 2D-elektroforéza, subproteomy, posttranslační modifikace

Obsah

1. Úvod
2. Popisná nebo dynamická proteomika?
3. Proteomové signatury
4. Volba fyziologických podmínek
5. Subproteomy
 - 5.1. Buněčné frakce
 - 5.2. Fyzikálně-chemické vlastnosti
 - 5.3. Funkční nebo strukturální vlastnosti
 - 5.4. Posttranslační modifikace
6. Perspektivy – od expresních profilů k regulačním sítím a systémové biologii

1. Úvod

Biologický výzkum prošel v posledních letech zásadním posunem spočívajícím v propojení klasických molekulárně-genetických a biochemických technik s metodami fyzikálními, fyzikálně-chemickými a matematickými, což vedlo k vytvoření systému tzv. komplexní molekulární biologie. Proteomika jako jedna z nově vzniklých disciplín komplexní molekulární biologie prodělala obdobně dynamický vývoj, který čerpá z neobyčejného rozmachu genetiky. Ten v současné době přinesl znalost kompletní sekvence genomů několika stovek prokaryotních a eukaryotních organismů, počínaje nejjednoduššími bakteriemi a konče člověkem. Komplexní molekulární biologie přináší další rozměr do studia molekulární podstaty života tím, že dovoluje zkoumat nejrůznější fyziologické jevy v jejich složitosti. Na rozdíl od klasické molekulární biologie nestuduje jednotlivé geny nebo jejich malé skupiny, ale dovoluje studium celých genomů a exprese jejich velkých částí v čase i prostoru a tím poznání celých komplexů fyziologických aktivit organismů.

Obrovské množství sekvenačních dat popisujících struktury stále většího počtu genomů prokaryotních a eukaryotních organismů vyvolává potřebu efektivních a vysokokapacitních technik dovolujících přiřazení funkcí k jednotlivým genovým strukturám a odhalujících jejich vzájemnou interakci a v neposlední řadě i regulaci jejich exprese. Takové požadavky splňuje právě proteomika, která umožňuje sledovat současně většinu proteinů v buňce nebo tkáni a určit, jak jejich identitu, tak i úroveň jejich exprese danou jejich koncentrací v čase a prostoru. V kombinaci se znalostí kompletní sekvence genomu daného organismu pak umožňuje porozumět jednotlivým funkčním a regulačním genovým sítím a kaskádám. Spolu s analýzou exprese genů na úrovni mRNA (transkriptomika) a nízkomolekulárních metabolitů a signálních molekul (metabolomika) dovoluje vytvářet komplexní modely funkce buněk a tkání jednotlivých organismů.

Rozvoj metod, které proteomika využívá, dovoluje nejen hlubší pohled do systému přenosu a exprese genetické informace, ale tak jak se zvyšuje kapacita těchto technik, rozšiřuje se i oblast jejich využití, a to zejména v moderních biotechnologiích. Uplatnění nacházejí zvláště ve vyhledávání nových léčiv a biologicky aktivních látek a v identifikaci zásahových míst pro tato nová, stejně jako i pro dosud využívaná léčiva. Vzhledem k tomu, že nedávno vyšel v Chemických listech přehledný článek zabývající se základními principy a metodami používanými v proteomice¹, budeme se v tomto přehledu věnovat spíše některým experimentálním strategiím a aplikacím využívaným zejména v mikrobiologii.

Tak jako při vzniku a rozvoji řady oblastí molekulární biologie a biochemie sehrály významnou roli mikroorganismy a zejména bakterie, tak také stály u zrodu proteomiky. Mimo základní rys, že jde ve své většině o jednobuněčné organismy a tedy o zdroj biologicky homogenního materiálu, představují bakterie, díky krátké době zdvojnásobení jejich populací a možnosti získat obrovské množství jedinců, i fyziologicky velmi zajímavý model. V současné době mikrobiální proteomika nepředstavuje pouze metodické „cviště“ pro vývoj a testování nejrůznějších technik využitelných při studiu proteomů vyšších organismů a člověka, ale vzhledem k jejímu významu právě pro člověka představuje zcela svébytnou a dynamicky se rozvíjející oblast proteomiky^{2,3}. Je možné definovat dva nejrychleji se rozvíjející směry v mikrobiální proteomice. V první řadě je to výzkum patogenních mikroorganismů, kde jde jednak o identifikaci virulentních faktorů, a tím poznání molekulárních mechanismů patogenicity, a dále pak o studium interakce hostitel-patogen. Protože v centru zájmu genomiky jsou zejména bakterie, které jsou původci řady infekčních onemocnění, zvyšuje se i zájem o studium jejich proteomů. Často se využívá tzv. srovnávací proteomiky, kdy se porovnávají proteiny příbuzných

patogenních a nepatogenních bakterií⁴. Toho bylo např. využito při studiu proteomu původce tuberkulózy *Mycobacterium tuberculosis*⁵. Prohloubení znalostí o proteinech, které se podílejí na pronikání patogenní bakterie do hostitelské buňky, umožnilo jejich odlišení od proteinů hostitele, a tím i studium interaktivních proteomů infikovaných buněk nebo tkání a patogenních bakterií. Toho bylo například využito při studiu interakce *Francisella tularensis* a makrofágů⁶ nebo bakterií *Neisseria meningitidis* a jejich hostitelských epiteliálních buněk⁷.

Další oblastí, která je v centru zájmu mikrobiální proteomiky, jsou biotechnologie, které buď využívají bakterie k výrobě nejrůznějších produktů, zejména v potravinářském průmyslu, anebo jako producenty léčiv, zejména antibiotik, či při výrobě nových vakcín⁸. Mikrobiální proteomika přispívá také výraznou měrou k řešení jednoho ze zásadních problémů při potírání infekčních onemocnění, kterým je široce rozšířená rezistence většiny patogenních mikroorganismů k antibiotikům⁹.

Mimo uvedené praktické aplikace je však mikrobiální proteomika v současné době také základním systémovým prostředkem komplexní molekulární biologie při studiu bakteriální fyziologie^{10–12}.

2. Popisná nebo dynamická proteomika?

Za jeden ze základních cílů každé proteomové studie bývá považována identifikace jednotlivých proteinů rozdělených buď dvojrozměrnou gelovou elektroforézou¹³ nebo některou z chromatografických technik¹⁴. To předpokládá znalost kompletní primární sekvence a struktury genomu zkoumaného organismu nebo organismu, který je mu dostatečně příbuzný. Vlastní identifikace a přiřazení proteinu k odpovídajícímu genu probíhá některou ze stále se rozšiřujícího spektra metod hmotnostní spektrometrie¹⁵ a je základním principem popisné proteomiky.

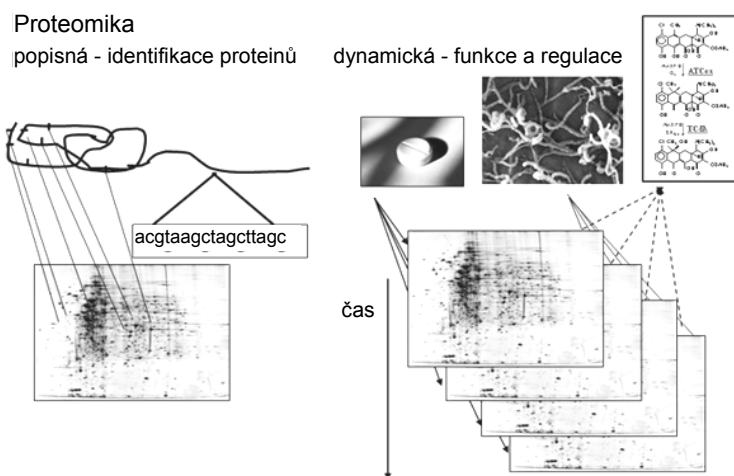
Nicméně je možné zvolit i metodický přístup, který se

do značné míry obejde bez znalostí získaných genomikou. V tomto případě se využívá postup, který pohlíží na studovaný proteom jako na soubor proteinů s neznámou identitou a sleduje jejich chování v čase. Dovoluje použít principy srovnávací proteomiky a s pomocí různých statistických metod dovoluje sestavení skupin proteinů, které vykazují identické charakteristiky a tvoří tzv. regulony. Ty představují uskupení proteinů, jejichž geny jsou regulovány identickými nebo podobnými regulačními mechanismy^{16,17}. Tento přístup je možno s výhodou využít ke sledování nejrůznějších metabolických systémů, které v bakteriální buňce zodpovídají za procesy jako je biosyntéza sekundárních metabolitů a zejména antibiotik, morfologická diferenciacie nebo reakce na změnu růstových podmínek, či stres^{16,18} a je označován jako kvantitativní nebo dynamická proteomika (obr. 1).

Pro zařazení proteinů do regulačních uskupení je třeba provést obrazovou analýzu dvojrozměrných elektroforetických gelů, což dovoluje vytvořit expresní profily jednotlivých proteinů, které jsou určeny jejich koncentrací v čase. Tento přístup jsme využili i v naší laboratoři při studiu biosyntetické dráhy chlortetracyklinů u *Streptomyces aureofaciens*¹⁹. Pro rekonstrukci metabolických regulačních sítí je samozřejmě optimální kombinovat oba přístupy, popisnou proteomiku, tedy identifikaci jednotlivých proteinů, spolu s analýzou jejich expresních profilů v rámci analýzy dynamických proteomů¹¹ (obr. 1).

3. Proteomové signatury

Tak, jak jsou objasňovány principy fungování a regulace u stále komplexnějších metabolických systémů, ukazuje se, že v nich se uplatňují i geny a z nich exprimované proteiny, které nesouvisí jednoznačně se sledovanou aktivitou. Např. biosyntéza určité přírodní látky, např. antibiotika, nezávisí pouze na expresi genů kódujících biosyntetické enzymy a jejich regulátory, ale ovlivňuje ji řada meta-

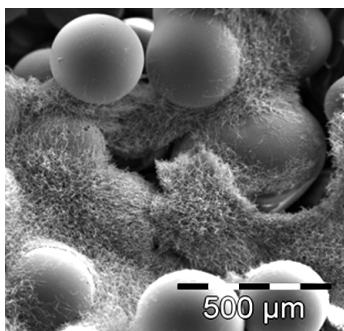


Obr. 1. Schéma principu popisné a dynamické proteomiky

bolických drah s touto aktivitou přímo nesouvisejících^{20–23}. Každá bakteriální aktivita je tedy charakterizována určitým proteinovým profilem neboli proteomovou signaturou²⁴ reprezentovanou oběma typy proteinů. Každá proteomová signatura charakterizuje jednoznačně sledovaný fyziologický stav, nicméně vyskytují se určité, i velmi odlišné fyziologické situace, které jsou charakterizovány podobnými nebo stejnými proteomovými signaturami^{25,12}. Jde například o proteomové signatury reflektující interakci bakteriální buňky s antibiotikem na jedné straně a reakci na chladový či teplotní stres^{11,12} na straně druhé. Aby bylo možné přiřadit jednoznačně určitému fyziologickému stavu konkrétní proteomový profil nebo signaturu, je třeba studovat tento stav z několika úhlů pohledu a experimentální data extrahovat z dostatečného počtu jejich zdrojů, např. dvojrozměrných elektroforetických gelů, získaných za různých podmínek. To pak umožňuje rekonstruovat příslušné metabolické a regulační dráhy způsobem, který se co nejvíce blíží reálné situaci v buňce.

4. Volba fyziologických podmínek

Při navrhování proteomických experimentů je důležitá správná volba fyziologických podmínek, za nichž jsou získávány vzorky k analýze, tak aby získané výsledky co nejlépe odpovídaly situaci v přirozeném životním prostředí jednotlivých mikroorganismů. Studujeme-li např. funkční a regulační mechanismy biosyntézy antibiotik, ke které dochází v souvislosti se změnami v životním cyklu produkčních bakterií, je třeba expresi proteinů studovat za těchto fyziologických podmínek. Téměř tři čtvrtiny antibiotik, která jsou využívána v medicínské nebo veterinární praxi, jsou produkovány streptomycetami, skupinou převážně půdních bakterií s velmi složitým životním cyklem. Bylo prokázáno, že biosyntéza antibiotik (biochemická diferenciací) úzce souvisí s morfologickou diferenciací u těchto bakterií^{26,27}. Přestože streptomycety jsou schopné produkovat antibiotika i v situaci, kdy k těmto morfologickým změnám nedochází, je pro objasnění vztahu biochemické a morfologické diferenciací nutné kultivovat je za podmínek, kdy dochází k oběma typům diferenciací. Z těchto důvodů jsme v naší



Obr. 2. Kultivace a diferenciací *Streptomyces coelicolor* na skleněných kuličkách

laboratoři vyvinuli kultivační systém, který toto dovoluje. Tato kultivační technologie, vyvinutá pro účely proteomových studií diferenciací streptomycet, využívá jako oporu pro růst skleněné kuličky o průměru 265 až 325 μm a jako dynamickou složku běžná kapalná živná média využívaná pro submersní kultivaci streptomycet²⁸. Principem systému je kapalně kultivační médium udržované kapilárními silami v prostoru mezi skleněnými kuličkami, z něj substrátové mycelium čerpá živiny. Povrch kuliček poskytuje mechanickou oporu pro růst jednotlivých vláken a jejich následnou přeměnu ve vzdušné mycelium a řetízky spór (obr. 2).

Produkcí pigmentovaných antibiotik, doprovázející morfologické změny, jsme demonstrovali u *Streptomyces lividans*, kde tvorba červeného pigmentu (antibiotika) byla mnohem výraznější na skleněných kuličkách než ve stejném kapalném médiu nebo na agaru. Systém dovoluje snadné značení buněčných proteinů radioaktivními aminosylinami přidanými do definovaného kapalného média, snadné rozbíjení buněk s využitím skleněných kuliček a reprodukovatelnou přípravu dostatečného množství proteinových vzorků pro proteomové analýzy.

Obdobný problém volby vhodných fyziologických podmínek nastává při studiu patogenních mikroorganismů, které jsou kultivovány v laboratoři v kapalných půdách anebo na agarových plotnách. Tento způsob kultivace se však výrazně liší od životních podmínek, ve kterých se vyskytují v buňkách nebo orgánech hostitelů. Např. u enterobakterií jsou podmínky laboratorní kultivace značně vzdálené od podmínek panujících v trávicím traktu hostitele. V tomto případě je podle našeho názoru podstatně vhodnějším systémem kontinuální kultivace v chemostatu. Dovoluje udržovat konstantní velikost populace a nastavit růstovou rychlost, což může lépe napodobit přirozené životní prostředí enterobakterií.

5. Subproteomy

Rozdělením proteomu jako souboru všech proteinů v buňce na menší jasně definované skupiny se vytváří tzv. subproteomy. Rozlišovací schopnost dvojrozměrné elektroforézy a dalších separačních metod je poměrně značná, v některých případech její teoretická hranice překračuje u některých bakterií i celkový počet otevřených čtecích rámců (genů kódujících proteiny). Nicméně reálné možnosti těchto separačních systémů jsou jiné. V první řadě, nikoli nezanedbatelný počet proteinů, se na gelu neobjeví prostě díky omezeným možnostem separační metody, jejich molární hmotnost nebo izoelektrický bod jsou mimo rozsah použitý v dané separaci, stejně jako řada z proteinů je velmi špatně rozpustná nebo vázaná na různé buněčné struktury a do elektroforetického gelového systému se nedostanou. V neposlední řadě častým důvodem, proč proteiny, které jsou v centru našeho zájmu, na gelech nevidíme, je to, že se vyskytují v buňkách ve velmi nízké koncentraci. Obecně, velké rozdíly v koncentraci proteinů v buňkách jsou jedním ze zásadních problémů při analýze

proteomů. Jedním z přístupů k jeho řešení, zejména při použití dvojrozměrné elektroforézy, je analýza tzv. subproteomů, kdy se množina proteinů, kterými se současně zabýváme, nějakým přesně definovaným způsobem zmenší^{29,30}. Velmi často se k tomu využívají nejruznější chromatografické techniky předřazené před dvojrozměrnou elektroforézou³¹.

To vede nejen k výběru určité menší skupiny proteinů na základě některých jim společných vlastností, ale i k relativnímu zvýšení koncentrace proteinů vyskytujících se v buňkách často v malém množství. V následujících odstavcích se zmíníme o několika způsobech, jak takovéto subproteomy vytvářet a analyzovat. Je třeba zdůraznit, že řada těchto způsobů využívá kombinace některých z níže uvedených principů, a proto námi použité dělení je pouze orientační.

5.1. Buněčné frakce

Jedním z nejjednodušších způsobů, jak rozdělit buněčný materiál získaný po rozbití buněk, je separovat jej na subbuněčné frakce diferenciální centrifugací. Většinou je možné oddělit membránovou frakci a frakci rozpustných (cytoplazmatických) proteinů, která je zbavena všech částic sedimentujících při 30 000 × g. Podobnou technologii používáme při studiu potenciální signální funkce proteosyntetického elongačního faktoru EF-Tu vázaného na membrány u streptomycet (obr. 3). V tomto případě nejde o izolované membránové proteiny, ale o hrubou membránovou frakci obsahující řadu proteinů s membránami pouze asociovaných. U patogenních bakterií hrají membrány, vedle buněčné stěny, významnou roli v mechanismech virulence, jak bylo prokázáno v proteomových studiích u *Listeria monocytogenes*³² a *Bartonella henselae*³³. Studium subproteomů bakteriálních membrán vyžaduje řadu speciálních biochemických technik při přípravě proteinových vzorků, protože tyto proteiny jsou velmi často špatně rozpustné. Pro úspěšnou izolaci neexistuje žádná univerzální metoda a úspěch se většinou dostává jako výsledek mnoha pokusů a omylů. Většinou jde o nalezení vhodné kombinace detergentů a denaturačních činidel^{34,35}.

Mimo rozdělení buněčných homogenátů na membránou a rozpustnou frakci je možné vyčlenit další subproteom, kterým je ribosomální frakce a s ní asociované proteiny³⁶. Dávno před vznikem proteomiky byly ribosomální



Obr. 3. Frakcionace proteinů *Streptomyces coelicolor* na membránový a cytoplazmatický proteom; dvojrozměrná elektroforetická analýza membránového (a) a cytoplazmatického (b) proteomu. Dělení v prvním rozměru probíhalo na IPG proužcích s rozpětím pH 4-7 a proteiny byly obarveny stříbrem

proteiny separovány ve dvojrozměrných elektroforetických systémech, založených ale na jiných principech než je O'Farrellův systém³⁷, který je základem proteomických analýz. Rozvoj systému imobilizovaných pH gradientových (IPG) proužků dovolil i dělení silně basických proteinů, jakými je většina ribosomálních proteinů³⁶ a nahradil tak, v mnoha směrech nedokonalý, systém nerovnovážné dvojrozměrné elektroforézy³⁸.

5.2. Fyzikálně-chemické vlastnosti

Dalším způsobem, jak rozdělit bohaté směsi buněčných proteinů, je využít jejich některých fyzikálně-chemických vlastností. S výhodou je možné využít ty, na nichž je právě dvojrozměrná elektroforéza založena, tj. izoelektrického bodu a molekulové hmotnosti. Použití imobilizovaných pH gradientů (IPG) s malým rozmezím pH v prvním rozměru dělení dvojrozměrné elektroforézy dovoluje vytvořit sérii subproteomů pokrývajících celý rozsah pH, ve kterém se vyskytují izoelektrické body proteinů přítomných v buňkách. To opět vede k podstatnému snížení počtu proteinů při jednom dělení a k jejich relativnímu zkoncentrování³⁹. Technika dospěla k tomu, že je možné v laboratoři připravit proužky IPG, které mají rozsah jedné jednotky pH a náklady na jejich výrobu jsou podstatně nižší než u komerčně dostupných.

Využití rozdílů v molekulových hmotnostech proteinů není zdaleka tak efektivní a mnohostranné jako v případě izoelektrických bodů, nicméně využití gradientových gelů SDS ve druhém rozměru dělení výrazným způsobem zlepšuje rozlišení na výsledných proteinových mapách.

5.3. Funkční nebo strukturní vlastnosti

Dělení (frakcionace), nebo spíše prefrakcionace buněčných proteinů na základě jejich funkčních nebo strukturních vlastností, je dalším způsobem, jak „zaostřit“ experimentální postupy při vyhledávání a identifikaci určitých skupin proteinů. Velmi často se pro prefrakcionaci využívá schopnosti řady proteinů vázat nízkomolekulární ligandy. Tyto proteiny se pak dělí nejčastěji afinitní chromatografií, kdy je na matici imobilizován samotný ligand nebo látka jeho vlastnosti napodobující. Těchto postupů se s výhodou využívá při izolaci GTP- nebo ATP-vazebných proteinů, či proteinů interagujících s DNA. Neméně důležitou vlastností proteinů je jejich schopnost interagovat s jinými proteiny. Informace o interakcích mezi proteiny významně napomáhají k objasnění jejich funkce a zároveň dovolují upřesnit jejich místo v buněčných regulačních schématech. Úspěch tzv. dvojhybridového systému vytvořeného u kvasinek pro identifikaci interakcí protein-protein vedl k tomu, že podobné systémy byly použity i u řady bakterií⁴¹. Aplikace těchto systémů na celé genomy pak dovoluje vytvořit interakční mapy pro kompletní proteomy u jednotlivých mikroorganismů.

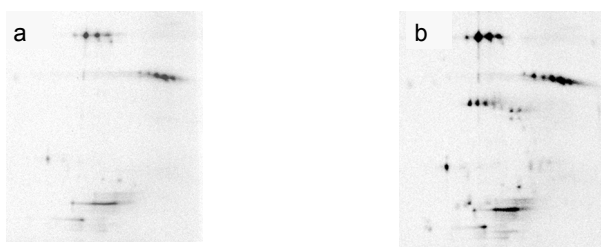
5.4. Posttranslační modifikace

Posttranslační modifikace regulují aktivity většiny proteinů u eukaryotních organismů a v poslední době se

ukazuje, že představují významný regulační mechanismus i u bakterií. Sekvence řady bakteriálních genomů odhaluje u některých z nich přítomnost řady protein kinas, a to nejen jako součásti u prokaryot rozšířených, dvousložkových regulačních systémů, ale i kinas tzv. ekaryotního typu fosforylujících serinové, threoninové nebo tyrosinové zbytky^{42,43}.

V několika nedávno publikovaných proteomových studiích u *Streptomyces coelicolor* byla identifikována celá řada proteinů tvořících metabolické dráhy primárního i sekundárního metabolismu a ukázalo se, že poměr mezi počtem genů a proteinů je asi kolem 1,2, což naznačuje, že nezanedbatelná část proteinů prochází posttranslačními modifikacemi. S použitím hmotnostní spektrometrie byly demonstrovány příklady *N*-acetylací, adenylací a samozřejmě i fosforylací⁴⁴. Techniky, které byly původně vyvinuty pro studium jednotlivých proteinů, je možno nyní systematicky aplikovat na celé populace proteinů a získat tak podstatně detailnější informace o jejich biologické funkci. Podstatným způsobem byly zlepšeny i techniky, které dovolují identifikovat a charakterizovat modifikační místa, sekvenovat peptidy, na kterých jsou lokalizována a s využitím metod značení stabilními izotopy pak i sledovat dynamiku vzniku modifikací⁴⁵. Posttranslační modifikace hrají významnou roli v regulaci řady metabolických dějů u bakterií, a to jak v primárním nebo sekundárním metabolismu, tak i u mikrobiálních patogenů v mechanismech řídicích jejich virulenci. V naší laboratoři se zabýváme studiem posttranslačních modifikací a zejména fosforylací EF-Tu a využíváme při tom analýzy kombinace dvou subproteomů – membránového proteomu a fosfoproteomu (obr. 4a). Při studiu fosforylačních aktivit v membránové frakci využíváme obohacení membránové proteinové frakce přidáním přečištěným elongačním faktorem Tu, což dovoluje zesílit fosforylační signál (obr. 4b). Ve spolupráci s laboratoří molekulární biologie patogenů jsme podobně analyzovali acylaci adenylátcyklasového toxinu u *Bordetella pertussis*, původce černého kašle, který zde představuje významný virulenční faktor⁴⁶.

Jako další příklad významu posttranslačních modifi-



Obr. 4. Membránový fosfoproteom *Streptomyces coelicolor*; fosforylační reakce s proteiny membránové frakce *S. coelicolor* a ATP jako donorem fosfátové skupiny probíhala *in vitro*. Proteiny byly v prvním rozměru separovány na proužcích IPG s rozpětím pH 4-7 a radioaktivně označené proteiny byly detegovány ve fosfo-imageru Fuji BAS5000. K membránové frakci (a) byl přidán přečištěný elongační faktor Tu jako potenciální substrát pro proteinkinasovou reakci (b)

kací u patogenních bakterií je možné uvést fosforylace na tyrosinu u *Helicobacter pylori*, kde mnohočetné fosforylace proteinu CagA mohou ovlivňovat přenos signálů, a tak se účastnit rozvoje gastrického onemocnění způsobeného touto bakterií⁴⁷. Separace nebo zvýraznění posttranslačně modifikovaných proteinů je tedy další cestou k vytvoření lépe analyzovatelných subproteomů.

6. Perspektivy – od expresních profilů k regulačním sítím a systémové biologii

V současné době, kdy se zdá být rozvoj proteomiky právě na vrcholu, se začíná rýsovat několik základních směrů v perspektivách dalšího směřování tohoto oboru. Začnou se totiž velmi brzy prolínat dvě základní koncepce proteomiky – popisná, přiřazující jednotlivé proteiny k příslušným genům, a kvantitativní, sledující dynamiku exprese genů v čase a prostoru. Zároveň se odděluje vysokokapacitní automatizovaná a robotizovaná proteomika, provozovaná zejména velkými biotechnologickými firmami a některými velkými a bohatými laboratořemi, od podstatně méně finančně a přístrojově náročných proteomiky v běžných akademických institucích, která se zabývá hlavně studiem fyziologicky jasně definovaných subproteomů. Zatímco průmysl hledá v proteomice rychlou návratnost velkých investic ve formě nových léčiv a diagnostických postupů, pro akademické instituce se otevírá obrovské množství možností využít v současnosti velmi rozvinuté proteomové technologie v menších přesně zacílených projektech, studujících nejrůznější dílčí biologické problémy a vyžadujících spíše než automatizované továrny na proteomy velkou dávku invence a kvalitní experimentální strategii při plánování experimentů.

Rychlý rozvoj bioinformatiky v posledních letech umožnil podstatně efektivnější zpracování obrovského množství proteomových dat, a tím rekonstrukci nebo modelování i velmi komplikovaných regulačních genových sítí^{48,49}. Od nich je pak jen malý krok k naplnění obsahu a perspektiv nově vznikající biologické disciplíny, která nese název systémová biologie. Jejím hlavním cílem je pochopení konstrukce a řízení biologických procesů na systémové úrovni. Na rozdíl od klasické molekulární biologie, kde jsou studovány jednotlivé komponenty systému, jako jsou nukleové kyseliny, proteiny nebo metabolity, systémová biologie zkoumá organismy s využitím znalostí charakteristik jednotlivých jejich komponent a zaměřuje se na jejich dynamický vývoj a interakce^{50,51}.

Práce byla podpořena granty GA ČR 204/03/1014, 301/03/0292 a výzkumným záměrem AV0Z50200510.

LITERATURA

- Collinsová M., Jiráček J.: Chem. Listy 98, 1112 (2004).
- Washburn M. P., Yates J. R.: Curr. Opin. Microbiol. 3, 292 (2000).

3. Cash P.: *Electrophoresis* 21, 1187 (2000).
4. Cordwell S. J., Nouwens A. S., Walsh B. J.: *Proteomics* 1, 461 (2001).
5. Jungblut P. R., Schaible U. E., Mollenkopf H. J., Zimny-Arndt U., Raupach B., Mattow J., Halada P., Lamer S., Hagens K., Kaufmann S. H.: *Mol. Microbiol.* 33, 1103 (1999).
6. Havlasová J., Hernychová L., Halada P., Pellantová V., Krejsek J., Stulík J., Macela A., Jungblut P. R., Larsson P., Forsman M.: *Proteomics* 2, 857 (2002).
7. Grifantini R., Bartolini E., Muzzi A., Draghi M., Frigimelica E., Berger J., Randazzo F., Grandi G.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 975, 202 (2002).
8. Grandi G.: *Trends Biotechnol.* 19, 181 (2001).
9. Cash P., Argo E., Ford L., Lawrie L., McKenzie H.: *Electrophoresis* 20, 2259 (1999).
10. Molloy M. P., Brzezinski E. E., Hang J., McDowell M. T., VanBogelen R. A.: *Proteomics* 3, 1912 (2003).
11. VanBogelen R. A., Molloy M. P.: *Proteomics* 3, 1833 (2003).
12. VanBogelen R. A.: *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 83, 27 (2003).
13. Gorg A.: *Proteomics: A Trends Guide* 2000, 2000, 3.
14. Washburn M., Yates J.: *Proteomics: A Trends Guide* 2000, 2000, 27.
15. Halada P., Řehulka P., Chmelík J.: *Chem. Listy* 99, 922 (2005)
16. Vohradský J., Li X.-M., Dale G., Folcher M., Nguyen L., Viollier P. H., Thompson C. J.: *J. Bacteriol.* 182, 4979 (2000).
17. Vohradský J., Li X. M., Thompson C. J.: *Electrophoresis* 18, 1418 (1997).
18. Grunenfelder B., Rummel G., Vohradský J., Roder D., Langen H., Jenal U.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4681 (2001).
19. Li X. M., Novotná J., Vohradský J., Weiser J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 717 (2001).
20. Martin J. F., Demain A. L.: *Microbiol. Rev.* 44, 230 (1980).
21. Vining L. C.: *Biotechnology* 28, 1 (1995).
22. Novotná J., Vohradský J., Berndt P., Gramajo H., Langen H., Li X. M., Minas W., Orsaria L., Roeder D., Thompson C. J.: *Mol. Microbiol.* 48, 1289 (2003).
23. Thompson C. J., Fink D., Nguyen L. D.: *Genome Biol.* 3, 1020 (2002).
24. VanBogelen R. A., Schiller E. E., Thomas J. D., Neidhardt F. C.: *Electrophoresis* 20, 2149 (1999).
25. VanBogelen R. A., Greis K. D., Blumenthal R. M., Tani T. H., Matthews R. G.: *Trends Microbiol.* 7, 320 (1999).
26. Chater K. F.: *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 667 (2001).
27. Chater K. F.: *Trends Genet.* 5, 372 (1989).
28. Nguyen L. D., Kalachová L., Novotná J., Holub M., Kofroňová O., Benada O., Thompson C. J., Weiser J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2848 (2005).
29. Cordwell S. J., Nouwens A. S., Verrills N. M., McPherson J. C., Hains P. G., Van Dyk D. D., Walsh B. J.: *Electrophoresis* 20, 3580 (1999).
30. Stasyk T., Huber L. A.: *Proteomics* 4, 3704 (2004).
31. Butt A., Davison M. D., Smith G. J., Young J. A., Gaskell S. J., Oliver S. G., Beynon R. J.: *Proteomics* 1, 42 (2001).
32. Schaumburg J., Diekmann O., Hagendorff P., Bergmann S., Rohde M., Hammerschmidt S., Jansch L., Wehland J., Karst U.: *Proteomics* 4, 2991 (2004).
33. Rhomberg T. A., Karlberg O., Mini T., Zimny-Arndt U., Wickenberg U., Rottgen M., Jungblut P. R., Jenö P., Andersson S. G. E., Dehio C.: *Proteomics* 4, 3021 (2004).
34. Freiburghaus A. U.: *Mol. Biotechnol.* 2, 281 (1994).
35. 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).
36. Fountoulakis M., Takacs B., Langen H.: *Electrophoresis* 19, 761 (1998).
37. O'Farrell P. H.: *J. Biol. Chem.* 250, 4007 (1975).
38. O'Farrell P. Z., Goodman H. M., O'Farrell P. H.: *Cell* 12, 1133 (1977).
39. Cordwell S. J., Nouwens A. S., Verrills N. M., Bassey D. J., Walsh B. J.: *Electrophoresis* 21, 1094 (2000).
40. Gorg A., Obermaier C., Boguth G., Weiss W.: *Electrophoresis* 20, 712 (1999).
41. Frederickson R. M.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 90 (1998).
42. Cozzone A. J.: *Biochimie* 80, 43 (1998).
43. Umeyama T., Lee P. C., Horinouchi S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 419 (2002).
44. Hesketh A. R., Chandra G., Shaw A. D., Rowland J. J., Kell D. B., Bibb M. J., Chater K. F.: *Mol. Microbiol.* 46, 917 (2002).
45. Mann M., Jensen O. N.: *Nat. Biotechnol.* 21, 255 (2003).
46. Basar T., Havlíček V., Bezoušková S., Hackett M., Šebo P.: *J. Biol. Chem.* 276, 348 (2001).
47. Backert S., Muller E. C., Jungblut P. R., Meyer T. F.: *Proteomics* 1, 608 (2001).
48. Vohradský J.: *FASEB J.* 15, 846 (2001).
49. Vohradský J.: *J. Biol. Chem.* 276, 36168 (2001).
50. Kitano H.: *Nature* 420, 206 (2002).
51. Kitano H.: *Science* 295, 1662 (2002).

J. Weiser, M. Holub, Š. Nezbedová, and S. Bezoušková (*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Proteomics Represents Complex Approach in Studies of Regulation of Bacterial Physiology**

This review deals with recent developments in complex molecular biology, which is moving from descriptive towards dynamic or quantitative proteomics, and its use as a tool in the studies of microbial physiology. It describes basic methodological strategies as well as examples of several projects where this approach is used in the studies of gene expression regulation in primary and secondary metabolism of industrially important bacteria.