

Odkud a kam míří proteomika ?

Hana Kovářová, Ilja Trebichavský, Karel Bezouška

*Není budoucnost a nikdy nebyla.
Skutečnou budoucností je dnešek.
(Miguel de Unamuno)*

Proteomika je studium souboru bílkovin (proteomu) v živém organismu nebo v jeho definované části. Je to dynamicky se vyvíjející obor — v posledním desetiletí všechny velké farmaceutické firmy vybudovaly vlastní proteomová centra a proteomické společnosti vyrostly jako houby po dešti. Byl spuštěn mezinárodní výzkum lidského proteomu HUPO (Human Proteome Organization), na jehož výsledky čeká netrpělivě medicína 21. století.

Co je to proteom?

Všechny živé buňky charakterizuje přítomnost nukleových kyselin (tvorí dědičnou výbavu zvanou genom) a bílkovin neboli proteinů. Proteiny vykonávají vlastní biologické funkce — zejména řízenou výměnu látek, energie a informace. Soubor všech proteinů byl poprvé nazván proteom na konferenci v Siene r. 1994 australským doktorandem Markem Wilkinsem.

Kompletní proteom určitého mnohobuněčného organismu je tedy souborem všech proteinů ze všech buněčných proteomů. Proteom je zpravidla větší než genom, protože geny mohou být různě přepisovány a proteiny mohou být ještě během syntézy dále pozměněny fosforečnými nebo cukernými skupinami.

Kromě kompletního proteomu rozeznáváme proteomy buněčné, ale také proteomy tkáňové, proteomy tělních tekutin (např. krve), proteomy buněčných ústrojků nebo proteomy bakterií či virů. Proteomem se tedy označuje celkový soubor proteinů určité biologické struktury či substance.

Co je to proteomika?

Proteomika se zabývá studiem proteomu. Cílem tohoto nového vědního oboru je analyzovat všechny proteiny v buňkách, tkáních či tělních tekutinách za různých podmínek, např. u zdravého či nemocného jedince. Z toho vyplývá, že proteomika je mnohem složitější než genomika — studium genomu.

Největší obtíže působí obrovská proměnlivost proteomu během růstu, diferenciaci, ale zejména během nemoci a stárnutí organismu nebo vlivem prostředí. Koncentrace jednotlivých proteinů v jediné buňce se přitom pohybuje v rozmezí devíti řádů. Není tedy divu, že zatímco lidský genom byl již rozluštěn, pro sestavení lidského proteomu bylo nezbytné vypracovat nové metody dělení a identifikace proteinů a jejich automatizaci. Proteomika se stala klíčem ke studiu dynamiky biologických dějů.

Od genomu k proteomu

Před r. 1990 se k identifikaci proteinů začalo používat sekvenování (určování

sledu jejich stavebních dílů — aminokyselin) neporušených molekul nebo enzymaticky vyštěpených fragmentů chemickou cestou. Tato technika ale byla pomalá a málo citlivá.

Když byly rozluštěny genomy několika živých organismů, začaly být proteiny určovány pomocí genové databáze, přičemž se vycházelo z toho, že nukleotidové sekvence genů kódujících stejné proteiny (např. určitý enzym přítomný u většiny živých organismů) jsou u různých druhů podobné. Tak pomohly třeba sekvence myších genů odhalit lidské geny s podobnými sekvencemi a tím i podobné proteiny člověka. Rychlost této metody byla omezena schopností určit alespoň částečnou informaci o sekvenci daného proteinu a srovnat ji s daty uloženými v počítačových databázích.

Dělení proteinů

Aby bylo možno proteiny skutečně určit, je nutné je napřed získat z jejich směsi. I tak zdánlivě jednoduchá tekutina, za jakou považujeme krev, obsahuje stovky různých proteinů. K jejich oddělení (separaci) se používá dvojrozměrná gelová elektroforéza (2-DE). Elektroforéza je metoda založená na dělení molekul v elektrickém poli. Dvojrozměrná se nazývá proto, že se proteiny nejdříve dělí v jednom směru podle svých nábojů a potom kolmo na tento podle velikosti. Výsledkem je proteinová mapa, na níž má každý protein svou specifickou polohu.

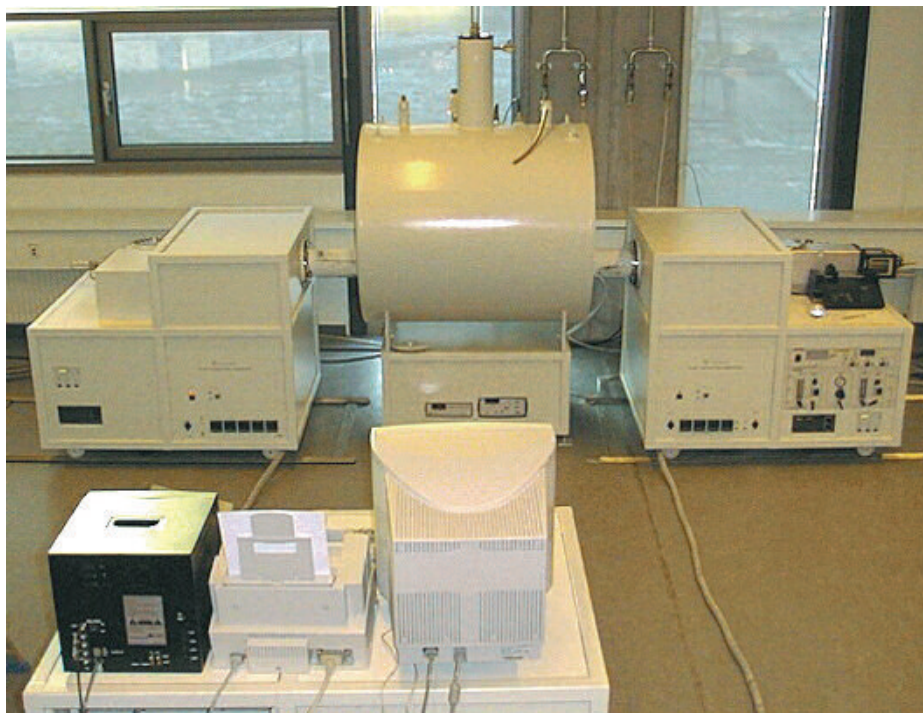
Metodu 2-DE popsali v r. 1975 nezávisle na sobě tři různí autoři. Již v 80. letech byla použita k porovnávání různých proteinových vzorků a sestavování proteinových databází. V té době byly také navrženy statistické metody hodnocení proteinových map. Rozsáhlejší identifikaci proteinů z elektroforetických gelů však umožnily teprve nové hmotnostní spektrometry na počátku 90. let 20. stol.

Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií

V hmotnostním spektrometru (viz obr.) se měří hmotnost (přesněji poměr hmotnosti k náboji) molekuly proteinu nebo peptidu vzniklého štěpením na menší části. Látka musí být nejprve ionizována a přenesena do vysokého vakua přístroje. Analýza proteinů hmotnostní spektrometrií nebyla zpočátku úspěšná, protože tato metoda poškozovala jejich obrovské a složité molekuly. V 80. letech byly proto vyvinuty nové hmotnostní spektrometry určené pro proteiny.

Samotné stanovení hmotnosti proteinů, není-li dostatečně přesné, však nestačí k jejich určení. To umožní teprve stanovení hmotnosti jejich fragmentů — peptidů, které vzniknou štěpením původního proteinu na určitých místech. Spektra peptidů se srovnávají s teoretickými spektry vypočítanými z databází. Tak vznikly metody známé jako proteinové hmotnostní mapování či otiskování.

Hmotnostní spektrometr pro přesné určení hmotnosti proteinů je schopen během hodiny analyzovat tisíce fragmentačních spekter peptidů vzniklých štěpením proteinů rozdělených dvourozměrnou elektroforézou



Technika dvojrozměrné gelové elektroforézy dělí směs proteinů podle jejich nábojů (zleva doprava) a jejich velikosti (shora dolů). Může rozdělit až několik tisíc proteinů. Jednotlivé skvrny na obrázku představují jednotlivé proteiny. Ty mohou být přímo v gelu dále štěpeny na peptidy, jejichž spektra v hmotnostním spektrometru proteiny identifikují. Snímky archiv autorů

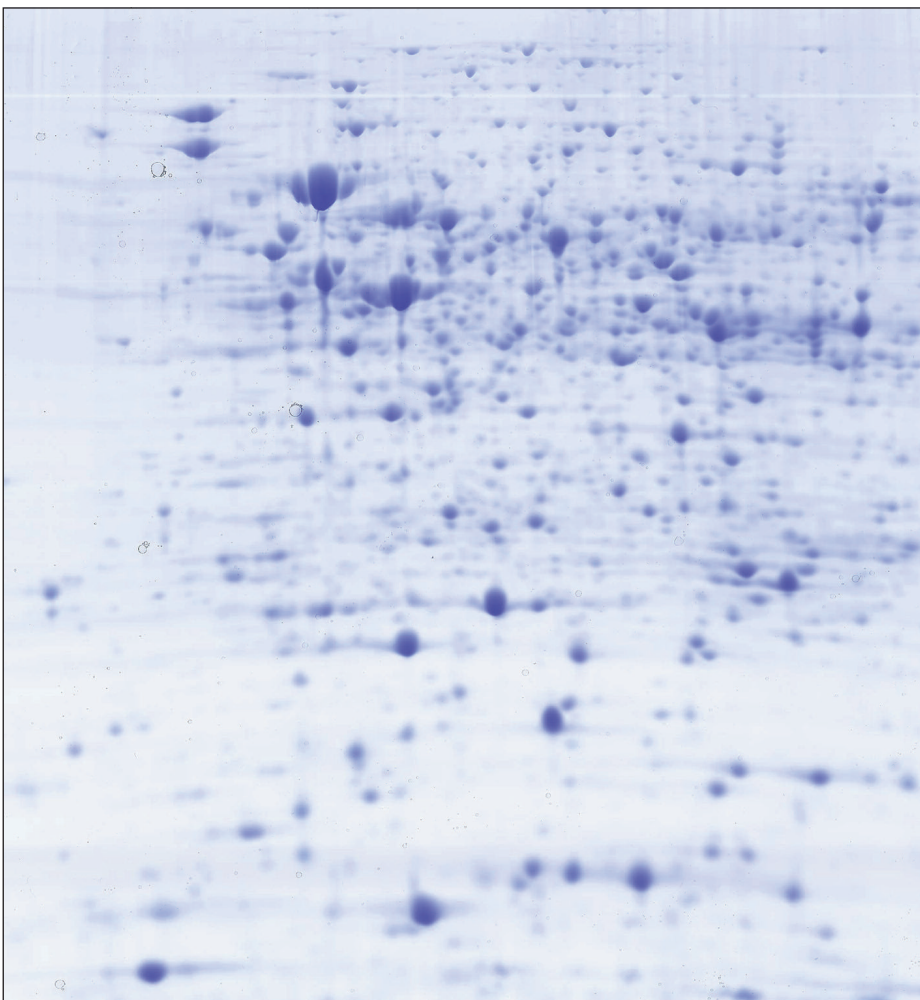
Proteomické továrny

Hledání určitých změn v proteomu připomíná hledání jehly v kupce sena. Proto se právě proteomika snaží zjednodušit přípravu vzorků a zautomatizovat jejich zpracování. Izotopové sondy k označení určitých aminokyselin, proteinové čipy, na nichž je cílový protein detekován protilátkou a optickou metodou, nebo mikrofluidika — to jsou názvy jen některých technik, které se rychle rozvíjejí v proteomických továrnách. Přístrojové celky jsou umístěny v továrních halách. Společnost GeneProt sídlící v Ženevě a v americkém státě New Jersey vlastní přes 50 hmotnostních spektrometrů a jeden z nejvýkonnějších počítačů v civilním sektoru. Množství dat produkovaných takovým zařízením je nepředstavitelné.

Pro některé soukromé firmy se současné nadšení proteomikou stalo jakousi obdobou zlaté horečky 19. stol. Investice do proteomiky v r. 1999 dosáhly 700 milionů dolarů, ale pro r. 2005 se odhadují na neuvěřitelný osminásobek této částky. Společnost Celera v Rockville (Maryland, USA), která se proslavila sekvenováním lidského genomu, připravuje srovnávání proteinů normálních a nemocných lidských tkání. Cellzome v německém Heidelbergu, CuraGen Corp. v New Haven a Myriad Proteomics v Kalifornii budou zkoumat proteinové interakce. MDS Proteomics v kanadském Torontu se zaměřily na identifikaci nádorových proteinů vhodných pro zásah protilátek i běžných léčiv a proteinů nitrobuňečné signalizace. Společnosti SGX a Syrrx v San Diegu se zabývají robotizací proteinové krystalografie, velkoobjemovou produkcí proteinových krystalů a jejich analýzou difrakcí rentgenových paprsků.

Lze patentovat bílkoviny?

Patentování lidského genomu je velmi rozporuplné a vyvolává rozsáhlé diskuse. Společnosti Human Genome Sciences z Rockvillu ve státě Maryland nebo Incyte Genomics z kalifornského Palo Alto jsou však již nositelkami více než 25 tisíc patentů souvisejících s informacemi pocházejícími z lidské DNA. Za skandální považují vědci patentování informací získaných veřejným konsorciem HUGO (Human Genome Organisation) financovaným z peněz daňových poplatníků. Řada firem, jako Oxford GlycoSciences ve Velké Británii však nyní argumentuje, že to není gen, který v sobě skrývá informaci nezbytnou pro praktické využití, ale právě jednotlivé proteinové produkty. Možnosti patentových právníků jsou zde prakticky neomezené vzhledem k ohromnému množství proteinů. Předpokládá se nicméně, že soukromé společnosti, které se dostanou do sporu o patentování určité biologické molekuly, se pokusí nejprve o dohodu



o dílčí sublicenci, aby se vyhnuly soudním sporům spojeným se vznášením protichůdných nároků. Takové spory již mají s vědeckým výzkumem málo společného.

Proteomika v lékařství

Velké americké státní instituce jako Národní ústav pro výzkum rakoviny (NCI) nebo Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) podporují výchovu odborníků v proteomice a standardizaci metodik tak, aby se co nejrychleji uplatnily v klinické medicíně. Počítá se s tím, že by k identifikaci abnormálních proteinů mělo stačit několik tisíc nemocných buněk nebo kapka tělní tekutiny, takže proteomika se zařadí mezi neinvazivní (pacienta nezatěžující) metody. Podobně, jako se dnes v krevním séru stanovují různé biochemické a enzymatické parametry, budou se vzorky podrobovat rutinní proteinové analýze po podání běžných léků, aby bylo možné zjistit, které proteiny byly indukovány či které proteiny se účastní nežádoucích vedlejších účinků.

Výzkum lidského proteomu

Projekt rozluštění lidského proteomu se odlišuje od projektu lidského genomu zejména technologicky. To vede k možnosti zapojit vědce i z těch zemí, které mají v chemii proteinů velkou tradici a přitom se nezučastnily sekvenace genomu. V Moskvě vyrostlo pod vedením prof. A. I. Archakova velké centrum proteomiky. Velmi aktivní je v tomto směru také Jižní Korea a Singapur. Integrací proteomových center vyroste celosvětová síť. Na druhé konferenci o lidském proteomu v říjnu 2003 v Mon-

treálu již byly uveřejněny výsledky mezinárodního výzkumu proteinů plazmy a jater. Bylo zahájeno studium proteinů lidských nervových buněk.

Proteomika v České republice

Mezi významná pracoviště proteomiky u nás patří Společná proteomová laboratoř ústavů Akademie věd ČR (Mikrobiologického ústavu, zabývajícího se bakteriální proteomikou, Ústavu fyziologie a genetiky živočichů, studujícího proteom zrajícího savčího vajíčka a kmenových buněk, a Ústavu experimentální medicíny, sledujícího interakce jaderných proteinů) a firmy Immunotech, a. s., dále Ústav analytické chemie AV ČR a Přírodovědecká fakulta Masarykovy Univerzity v Brně (rostlinná proteomika) a pracoviště Ústavu molekulární patologie Univerzity obrany (proteomika původce tularémie *Francisella tularensis*). Dále se rozvíjí proteomika na univerzitách v Praze a Olomouci. Na podzim r. 2003 byla ustavena Proteomická sekce České společnosti pro biochemii a molekulární biologii a v červnu 2004 se konala první česká proteomická konference.

Proteomika je velmi významným vědním oborem počátku 21. stol. Poznání nových proteinů pomůže v blízké budoucnosti vysvětlit dosud neznámé aspekty biologických systémů. Poznání nových proteinů, které se vyskytují v lidském organismu v mizivých množstvích miliointin mikrogramů nebo po nesmírně krátkou dobu, umožní poznat složité regulace a hierarchické úrovně lidského organismu a položí solidní, i když složité základy pro klinickou medicínu zítřka.