

## SOUČASNÉ TRENDY V ANALÝZE EUKARYOTICKÝCH PROTEOMŮ, GLYKOMŮ A LIPIDOMŮ

PETR MAN<sup>a</sup> a KAREL BEZOUŠKA<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Mikrobiologický ústav AV ČR Praha, Videňská 1083, 142 20 Praha 4, <sup>b</sup> Katedra biochemie přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, Hlavova 8, 128 40 Praha 2  
bezouska@biomed.cas.cz

Došlo 12.9.05, přijato 18.11.05.

Klíčová slova: proteomika, eukaryotické organismy, glykomika, lipidomika

### Obsah

1. Úvod
2. Specifika eukaryotické proteomiky
3. Nové postupy eukaryotické proteomiky
4. Hlavní strategie glykomiky
5. Analýza glykosylací
6. Určení typu glykosylace
7. Nalezení glykosylačních míst a určení typu glykanů
8. Lipidomika
9. Závěr

### 1. Úvod

Cílem proteomiky je dynamické sledování veškerého souboru proteinů určité buňky, tkáně, nebo organismu. Nedávné desáté výročí tohoto nového experimentálního oboru představujícího důležitý milník na cestě od genetické informace k jejímu vyjádření v proteinech a současné systémové analýze veškerých fenotypových znaků vedlo k řadě diskusí a úvah o výsledcích, možnostech, omezeních a perspektivách současné proteomiky<sup>1</sup>. Zdaleka nejžhavější diskuse se přitom odehrávaly v oblasti proteomiky eukaryotických organismů. Je to způsobeno zejména tím, že zatímco při analýze genové exprese u bakterií často vystačíme s klasickou dvojrozměrnou proteinovou mapou používanou v biochemii již od poloviny 70. let minulého století<sup>2</sup>, je taková analýza jen ve výjimečných případech dostačující při zkoumání proteomů u eukaryotických organismů. Abychom mohli pochopit obtížnost vytyčení základní výzkumné linie v eukaryotické proteomice, o níž se tak vášnivě diskutuje v akademickém sektoru, v laboratořích proteomických firem, i na půdě mezinárodních proteomických organizací jako jsou Human Proteome

Organization (HUPO)<sup>3</sup> popř. právě ustavovaná European Proteomic Association (EuPA)<sup>4</sup>, musíme se nejprve zabývat některými specifiky eukaryotické proteomiky. Jde zejména o proteomiku člověka a jiných modelových organismů, jejichž genom již byl úplně nebo z velké většiny sekvenován.

### 2. Specifika eukaryotické proteomiky

Eukaryotická proteomika bývá často uváděna jako pokračování a vyústění eukaryotické genomiky, od níž převzala některé pohledy a přístupy. Přitom je však nezbytné si uvědomit, že z metodického hlediska představují proteiny naprosto svébytnou třídu biologických makromolekul značně odlišných od DNA. Proteiny nelze na rozdíl od DNA molekul namnožit *in vitro*, proto jsou dodnes proteomické experimenty závislé na izolacích proteinů z přirozených zdrojů, jejichž dostupnost je mnohdy omezená.

Expresí relativně malého počtu genů (asi 40 000 genů u člověka) vzniká ohromný počet proteinových molekul v důsledku existence genových polymorfismů, splicingových variant a posttranslačních modifikací (viz níže). Předpokládá se, že lidský proteom obsahuje přes milion různých proteinových molekul, byť stále nejsou k dispozici údaje pro kvalifikovanější odhad jejich počtu<sup>5</sup>.

V analyzovaných vzorcích eukaryotických proteomů se mohou proteiny vyskytovat v koncentracích, pohybujících se v rozmezí 10 řádů – zatímco koncentrace albuminu v lidském séru je 50 mg ml<sup>-1</sup>, koncentrace interleukinu-6 v témže materiálu činí 2 pg ml<sup>-1</sup> (cit.<sup>6,7</sup>). Tento ohromný koncentrační rozsah klade nejen mimořádné nároky na dynamický rozsah analytických metod, ale komplikuje i separační postupy, při nichž se separační účinnost často zhoršuje vlivem nejhojněji zastoupených proteinů.

Nedávné výzkumy dále ukazují, že za fyziologických podmínek se v buňce vyskytuje značné procento proteinů ve formě proteinových komplexů. Odhaduje se, že např. v kvasinkové buňce se může vyskytovat až polovina všech přítomných proteinů ve formě proteinových komplexů, z nichž 40 % je již detailně charakterizováno<sup>8</sup>. Kromě jednoduchých (binárních, ternárních nebo kvarterních) proteinových komplexů jsou fyziologicky velmi významné i dosti složité proteinové komplexy – např. ribosom obsahuje několik molekul ribonukleových kyselin a kolem stovky různých proteinů<sup>9</sup>.

Samostatnou kapitolou významně komplikující výzkum eukaryotických proteomů jsou potom posttranslační modifikace proteinů. Těch je dnes již popsána více než stovka a každým rokem přibývá kolem desítky nových. Jednou z nejsložitějších posttranslačních modifikací v proteomice je glykosylace, které jsou věnovány kapitoly

4–7 tohoto pojednání. Stejně rozmanité mohou být ovšem asociace proteinů s nepolárními lipidy, ať již jde o kovalentní lipidové modifikace, nebo asociace membránových proteinů s lipidy plasmatických membrán a membránových mikrodomén. Tomuto aspektu je věnována kapitola 8 tohoto přehledu.

Všechny výše uvedené charakteristiky eukaryotických proteomů kladou nejen vysoké nároky na použité analytické metody z hlediska jejich citlivosti, dynamického rozsahu a robustnosti, ale často vytyčují vysloveně protichůdné požadavky. Pro dokonalou separaci proteinových směsí je nezbytné pracovat s izolovanými polypeptidy za denaturujících podmínek, přitom se však ztrácí informace o biologických účincích proteinů a jejich uspořádání ve funkčně významných proteinových komplexech. Pro separaci a analýzu proteinových komponent eukaryotických proteomů je nezbytné z nich odstranit chemické substituenty vzniklé při posttranslačních modifikacích, ty však často definují jejich unikátní funkčně významné isoformy. To vše způsobuje, že v eukaryotické proteomice zatím neexistuje jediná všemi uznávaná centrální metoda nebo strategie výzkumu, jakou je např. amplifikace a sekvenování DNA v genomice. O různých přístupech a různých vědeckých školách v eukaryotické proteomice pojednává následující kapitola.

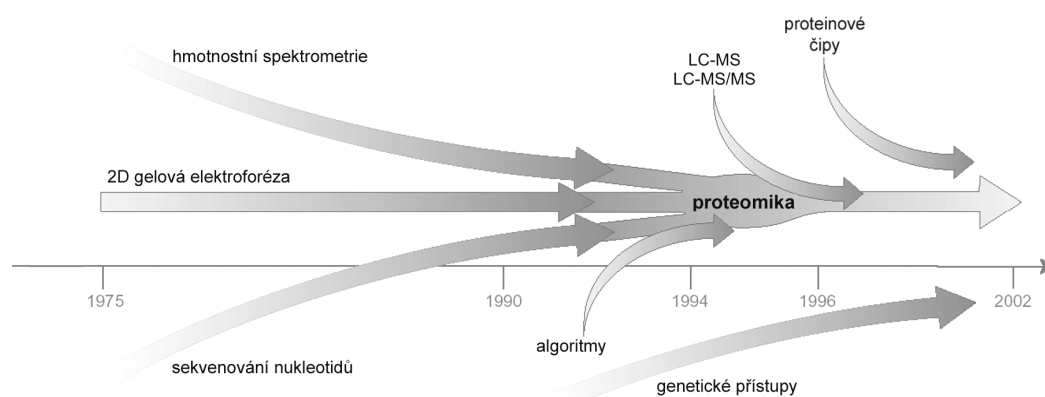
### 3. Nové postupy eukaryotické proteomiky

Přehled jednotlivých technik postupně aplikovaných ve výzkumu eukaryotických proteomů je znázorněn na obr. 1. Ačkoliv byla dvojrozměrná gelová elektroforéza dlouho hlavním a jediným nástrojem tohoto oboru<sup>10,11</sup>, počátkem 90. let bylo zřejmé, že již nedostačuje zvýšeným nárokům a často protichůdným potřebám jednotlivých experimentů. Klíčovým problémem se tehdy jevila sekvenční identifikace proteinových skvrn na dvojrozměrných mapách, která zůstávala nezbytnou podmínkou korelace proteinových map s biologii specifických proteinů obsaže-

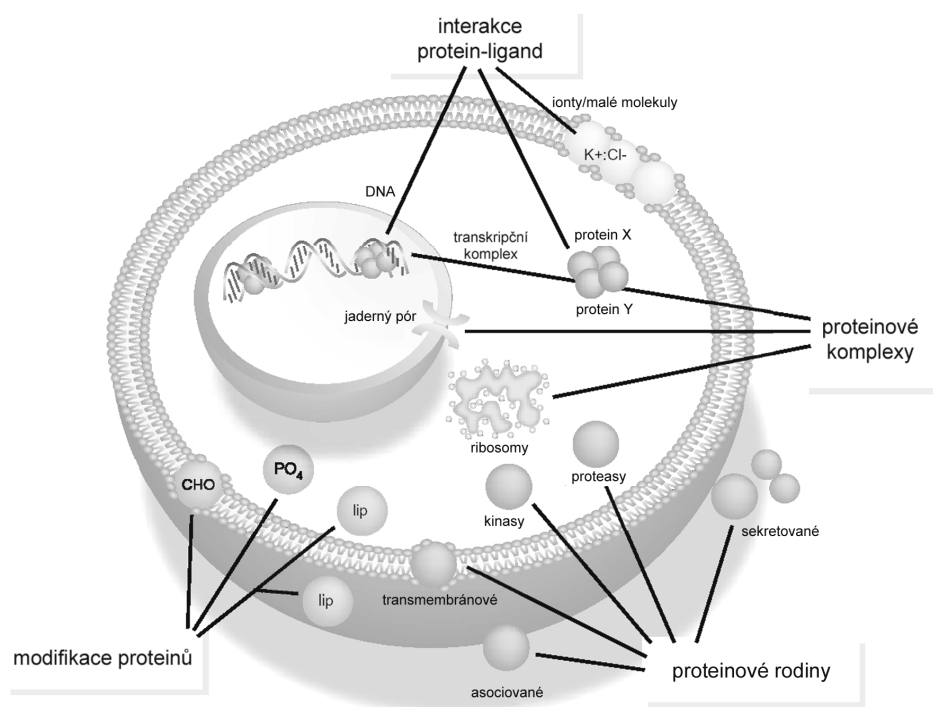
ných v databázích genetických sekvencí. V té době již bylo evidentní, že metody chemie proteinů, např. kvantitativní aminokyselinová analýza nebo *N*-terminální Edmanovo sekvenování, pro svou pomalost, pracnost a vysoké nároky na čistotu analyzovaných proteinů při řešení tohoto problému příliš nepomohou. Rychlého rozšíření však naopak dosáhly metody hmotnostní spektrometrie proteinů, jakmile byl v polovině 80. let rozřešen problém způsobu ionizace velkých, netěkavých proteinových molekul. Velmi oblíbeným nástrojem eukaryotické proteomiky se v tomto ohledu stala zejména metoda peptidového mapování založená na štěpení proteinů přímo v gelu a následné analýze hmotnostní spektrometrií – nejčastěji spojením ionizace MALDI<sup>12,13</sup> a průletového analyzátoru. Tato metoda ve spojení s programy prohledávajícími databáze proteinových a nukleotidových sekvencí dnes umožňuje rutinně identifikovat protein ze skvrny obsahující nanogramová množství proteinu. Na začátku 90. let bylo dalším významným pokrokem uvedení hmotnostně spektrometrické techniky založené na ionizaci elektrosprejem<sup>14</sup> do eukaryotické proteomiky, zejména poté, co byl Huntem a spol. prokázány možnosti této techniky založené na separacích na kapilárách spojených s tandemovou hmotnostní spektrometrií (odtud zkratka LC-MS/MS) při analýze složitých směsí peptidů eluovaných z molekul transplantačních antigenů<sup>15</sup>.

V současné době je v eukaryotické proteomice používán velmi široký soubor různých metodik. Jsou založené buď na výše popisovaných biochemických separacích spojených s hmotnostně spektrometrickou identifikací ať již v uspořádání „s gelem“ nebo „bez gelu“, popř. na analýze proteinových profilů s využitím jiných nástrojů kvantitativní proteomiky, jako je použití izotopových proteinových značek<sup>16</sup>, popřípadě proteinových čipů různé konstrukce<sup>17–19</sup>. Charakteristický je vysoký stupeň automatizace a robotizace, a to zejména ve firemních laboratořích, které dnes do oblasti eukaryotické proteomiky velmi masivně investují.

Výše popsanými analytickými nástroji řeší současná



Obr. 1. Technologie současné eukaryotické proteomiky



Obr. 2. Hlavní cíle eukaryotické proteomiky

eukaryotická proteomika několik okruhů otázek, jak je znázorněno na obr. 2. Oblastí aktivně rozvíjenou zejména farmaceutickými firmami je sledování interakcí protein-ligand (v daném případě protein-léčivo), pro což jsou vyvíjeny nové bioafinitní techniky včetně některých umožňujících vyhodnotit i slabé biologické interakce s disociačními konstantami milimolárního řádu. Velkou oblastí zájmu nadále zůstává analýza proteinových komplexů a proteinových profilů jednotlivých organel, jako je jádro nebo jaderná obálka<sup>20,21</sup>. Oblíbeným předmětem eukaryotické proteomiky je dále výzkum dynamiky jednotlivých rodin funkčně významných proteinů s jejich intracelulárními, jadernými a membránovými formami, a dále detailní výzkum funkčního významu proteinových modifikací, zejména fosforylací, glykosylací (viz. kapitoly 4–7) a lipidových modifikací (kapitola 8). Jednotlivé dílčí poznatky jsou potom integrovány do globálního obrazu eukaryotické buňky a jejich změn v průběhu klíčových fyziologických (buněčný cyklus, apoptóza) nebo patologických (infekce, nádorová transformace) procesů.

#### 4. Hlavní strategie glykomiky

Posttranslační modifikace proteinů představují dnes jeden z nejsložitějších problémů komplikující proteomické analýzy. Důvodem pro to je jak ohromný celkový počet těchto modifikací mnohonásobně přesahující celkový počet proteinů a jejich variant, tak zásadní význam těchto

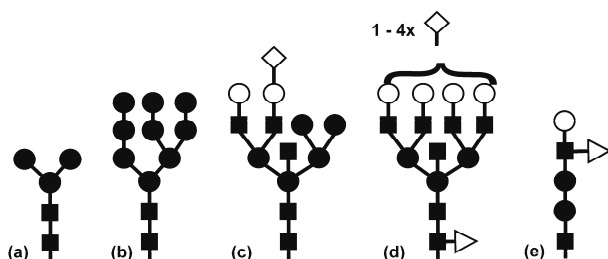
modifikací pro funkci bílkovin (ovlivňují zejména rozpustnost proteinů, jejich stabilitu, transport do specifických organel, enzymovou aktivitu, schopnost vázat ligandy a účastnit se předání signálu). Za jednu z nejvýznamnějších a nejsložitějších modifikací lze považovat glykosylace proteinů. Stejně tak jako se proteomika zabývá studiem proteinového komplementu genomu, je hlavním posláním glykomiky studovat glykosylace proteinů a lipidů. Cílem je získat znalosti o tom, jak glykosylace ovlivňuje funkci těchto molekul a také jak se mění glykosylace v různých stavech buňky nebo organismu. Tyto poznatky se poté dají aplikovat např. na diagnostiku onemocnění spjatých s chybnou glykosylací<sup>22–26</sup>. Prvním krokem je detailní popis glykosylací proteinů a s tím související rozvoj metodik umožňující rychlé a jednoznačné analýzy.

#### Základní poznatky o glykosylacích

Glykosylace plní zejména funkci ochrannou – brání proteolýze, působení nízkých či extrémně vysokých pH a ochraňují proteiny před volnými radikály. Dále také u řady proteinů napomáhají zaujmout správnou prostorovou strukturu, zajišťují dobrou rozpustnost, ovlivňují aktivitu enzymů, určují směřování uvnitř buňky a stabilizují proteiny uvolňované z buňky ven<sup>25</sup>. Sacharidy se také uplatňují při interakcích mezi různými buňkami, v mechanismu mikrobiální infekce, nebo mají podpůrnou funkci při interakci receptoru s ligandem<sup>27</sup>.

Odlišujeme dva základní druhy glykosylace *N*- a *O*-typu. U *N*-glykosylací je sacharid vázán na volný amidový dusík aminokyseliny asparaginu, který se navíc vyskytuje v tripletu asparagin, následovaný libovolnou aminokyselinou (pozice N+1) a hydroxyaminokyselinou (pozice N+2) – (Asn-Xaa-Ser/Thr). Je známo, že v pozici N+1 nemůže být prolin nebo kyselina asparagová. Tato pravidla jsou odvozena z faktu, že glykosylovány jsou v naprosté většině triplety, které se nalézají v  $\beta$ -strukturách nebo smyčkách a amidová skupina asparaginu zde tvoří vodíkový můstek s kyslíkem serinu nebo threoninu. Přítomnost prolinu by tvorbě tohoto můstku stericky bránila a skutečně není popsán žádný protein mající glykosylovaný triplet Asn-Pro-Ser/Thr. Při pohledu na pozici N+2 je zajímavé, že jsou známy proteiny, u nichž dochází k *N*-glykosylaci na tripletu Asn-Xaa-Cys (plasmový protein C a von Willebrandův faktor, aspartátové proteasy kvasinek). Z toho vyplývá, že kritéria pro připojení sacharidové struktury nejsou tolik striktní a hydroxyaminokyselina může být nahrazena cysteinem. Z pohledu sacharidu vycházíme u savčích *N*-glykosylací ze základní struktury – 2 *N*-acetylglukosaminy a 3 mannosy (obr. 3a). Od této struktury pak navázáním různých monosacharidových jednotek odvozujeme skupinu mannosových, komplexních a hybridních oligosacharidů (obr. 3b, 3c a 3d). Vedle variací co do počtu navázaných monosacharidů se však můžeme setkat i se strukturami zakončenými sulfátem či fosfátem. U vývojově nižších organismů a rostlin pak můžeme nalézt i struktury zcela odlišné od výše uvedených (obr. 3e).

Z hlediska biosyntézy je *N*-glykosylace kotranslačním jevem, neboť k připojení oligosacharidu k proteinu dochází v endoplasmatickém retikulu ještě před ukončením jeho biosyntézy. Výchozí oligosacharid je větvený, je charakteristický vysokým obsahem mannosy, a na jedné větvi je zakončen lineární sekvencí tří glukosylových zbytků. V endoplasmatickém retikulu a následně v Golgiho komplexu se postupně odštěpují glukosové a některé mannosové zbytky, a připojují se jiné monosacharidové jednotky. Evolučně původnější jsou struktury mannosového typu, u vyšších organismů je pak existence mannosových struktur známkou urychlené sekrece nebo metabolické poruchy<sup>29,30</sup>.



Obr. 3. Schématické znázornění hlavních *N*-vázaných oligosacharidových struktur; a) „jádro“ skládající se ze dvou *N*-acetyl-D-glukosaminů a tří D-mannos, b) příklad struktury s vysokým obsahem mannosy, c) hybridní struktura, d) komplexní struktura, e) příklad neobvyklého typu *N*-vázaného sacharidu. Symboly: ■ – *N*-acetyl-D-glukosamin, ● – D-mannosa, ○ – D-galaktosa, ◇ – kyseliny sialové, ▷ – L-fukosa

Zatímco *N*-glykosylace se řídí výše uvedenými pravidly, u glykosylací *O*-typu se doposud žádná pravidla nepodařilo nalézt. Sacharidová struktura (mono-, di-, tri-, či oligosacharid) je vázána přes hydroxyskupinu serinu nebo threoninu. Jsou však popsány i *O*-glykosylace na tyrosinu, hydroxyprolinu a hydroxylysinu. Základních osm savčích struktur představujících tzv. jádro, tvoří *N*-acetylglukosamin a na něj vázaný jeden či dva sacharidy (galaktosa, *N*-acetylglukosamin, *N*-acetylglukosamin). Od těchto osmi struktur se dále odvíjejí nejrozličnější typy oligosacharidů. *O*-Glykosylace se většinou neobjevuje na proteinech osamoceně, ale v určitých shlucích v oblastech bohatých na výskyt serinu a threoninu. Funkčně se *O*-glykosylace uplatňuje v tvorbě krevních skupin, účastní se na vývoji krevních buněk, a řada *O*-glykoproteinů se podílí na ochraně epitelu<sup>31</sup>.

## 5. Analýza glykosylací

Při analýze glykosylací je cílem:

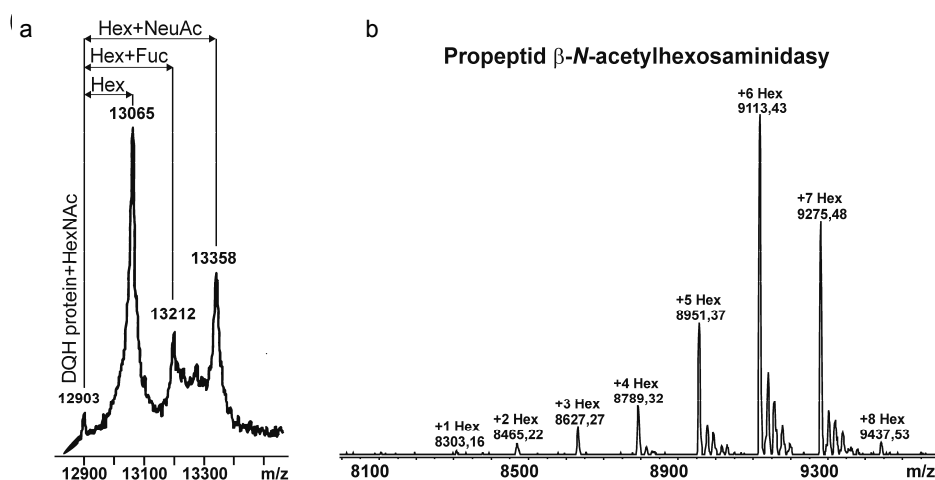
- zjištění, zda daný protein je či není glykosylován,
- určení typu glykosylace,
- nalezení glykosylačních míst,
- určení typu struktury a mikroheterogenity na jednotlivých místech.

V následujících kapitolách jsou probrány metodiky, které se k výše jmenovaným analýzám používají. Zvláštní důraz pak je kladen na hmotnostně spektrometrické techniky, které se dají považovat za nejuniverzálnější nástroj.

### Detekce glykoproteinů

Prvním a nejsnáze rozlišitelným znakem glykoproteinů je jejich charakteristická migrace při polyakrylamidové elektroforéze. U jednorozměrných gelů vidíme, že se daný pruh nesoustředí do tenké zóny, ale tvoří širší pruh. Na dvourozměrných gelech se glykoproteiny buď separují do řady bodů o stejné molekulové hmotnosti, ale mírně odlišném isoelektrickém bodu (pI) nebo tvoří tzv. „smear“ – protáhlý pás ve směru pI.

Další variantou detekce glykoproteinů je oxidace kyselinou jodistou nebo manganistanem a modifikace oxidovaného sacharidu buď barvivem Fuchsinem, fluorescenční značkou nebo biotinem s hydrazidovou skupinou. Zatímco modifikace biotinem a následná detekce streptavidinem konjugovaným s křenovou peroxidasou je určena pouze pro vzorky na poly(vinylidendifluoridové) membráně, dají se značení barvivem či fluorescenční značkou použít jak na membráně, tak v gelu. Detekční limity se pohybují mezi 25–100 ng pro barevné značení, 5–25 ng pro fluorescenci a 20–100 ng pro biotinylation. Jinou technikou, která nám navíc poskytne informaci o terminálních sacharidových jednotkách, je převrstvení proteiny schopnými sacharidy navázat<sup>32</sup>. V řadě případů však nejrychlejší odpověď poskytne analýza celého proteinu hmotnostní spektrometrií na MALDI nebo ESI-FT-ICR. Není-li pro-



Obr. 4. Příklady hmotnostních spekter glykoproteinů – identifikace glykoforem; a) DQH-protein nesoucí *O*-glykosylaci, měřeno v lineárním módu technikou MALDI-TOF; b) propeptid  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy nesoucí *O*-glykosylaci. Spektrum naměřené na ESI-FT-ICR odhaluje zastoupení jednotlivých glykoforem (od jedné hexosy až po 8 hexosy)

tein glykosylován, získá se jeden ostrý pík (pokud neuvažujeme výskyt vícenásobně nabitých iontů). Je-li protein glykosylován, projeví se klasická mikroheterogenita již na proteinovém spektru, ve kterém odhalíme sérii píků, jejichž vzdálenost odpovídá určitému sacharidu (hexose, deoxyhexose, kyselině sialové apod.) (obr. 4, cit. <sup>33,34</sup>). Zde je nutno říci, že hmotnostní spektrometrie není schopná odlišit od sebe např. jednotlivé hexosy. Ty mají totiž stejné složení a tím i stejnou molekulovou hmotnost. Proto rozeznává pouze sacharidy lišící se složením – hexosu od deoxyhexosy, hexosu od *N*-acetylhexosaminu apod. MALDI matrice používané pro analýzu malých glykoproteinů (do 10 000 Da) jsou kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB) nebo kyselina 3-hydroxy- $\alpha$ -kyano-skořicová (HCCA)<sup>35</sup>. Pro větší proteiny je pak praktičtější využívat kyselinu sinapovou (SA), 2,4,6-trihydroxyacetofenon (THAP) nebo kyselinu 2-(4-hydroxyfenylazo)benzoovou (HABA).

## 6. Určení typu glykosylace

Nejpoužívanějším přístupem je enzymová deglykosylace *N*-glykosidasou F (PNGasa F). Ta odštěpuje celou sacharidovou strukturu a zároveň s tím mění původně glykosylováný asparagin na aspartát. Byl-li protein *N*-glykosylován, projeví se deglykosylace jednak snížením molekulové hmotnosti a zároveň zaostřením pásu na gelové elektroforéze. Nevýhodou je, že řada proteinů po totální deglykosylaci zcela ztrácí své původní vlastnosti a snadno se sráží. PNGasa F navíc špatně odštěpuje glykany, které jsou fukosylovány na kotevním *N*-acetylglukosaminu. Alternativou k PNGase F je využití endoglykosidas (Endo H, Endo F1-3), které štěpí vazbu mezi *N*-acetylglukosaminu, z nichž jeden je vázán na asparagin. Výsledkem pak je protein, který na všech původně glykosylova-

ných místech nese jeden *N*-acetylglukosamin. Výhodou je, že takto deglykosylované proteiny si mnohdy zachovávají své původní vlastnosti. Při použití endoglykosidas je navíc možné přibližně určit typ *N*-vázaných oligosacharidů na daném proteinu. Zatímco Endo F1 odštěpuje sacharidovou strukturu u vysoce mannosových a hybridních glykanů, F2 funguje především u dvojitých a trojitých komplexních a pouze slabě u vysoce mannosových struktur, F3 je vhodná pro dvojitou a tříantenní struktury, které jsou navíc fukosylovány. Endo H neodštěpuje pouze složené oligosacharidy<sup>36</sup>.

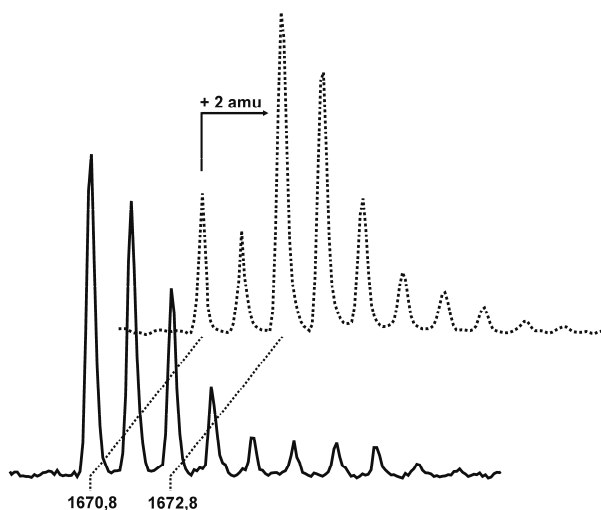
U *O*-glykosylaci bohužel neexistuje žádný univerzální přístup. *O*-Glykosidasy jsou vhodné pouze pro odštěpení malého počtu nepřliš složitých sacharidových sekvencí, a pro složitější struktury je nutná kombinace se specifickými exoglykosidasami.

Pokud enzymová štěpení neposkytují požadovaný výsledek, lze využít i řadu chemických metod. Pravděpodobně neznámější je hydrazinolýza. K odsolenému a čistému glykoproteinu se přidá bezvodý hydrazin a reakční směs se nechá inkubovat 4 h při 95 °C (odštěpí se *N*- i *O*-vázané sacharidy) nebo 5 hodin při 60 °C (mělo by dojít k selektivnímu odštěpení pouze *O*-vázaných sacharidů). Vzhledem k nebezpečnosti bezvodého hydrazinu je nutné pracovat s náležitou opatrností. Po skončení reakce je hydrazin odpařen na vakuové odparce a uvolněné sacharidové struktury se *N*-acetylují acetanhydridem v hydrogenuhlíčitanu sodném<sup>37</sup>. Hlavní nevýhodou hydrazinolýzy je destrukce proteinové části a navíc u *O*-glykoproteinů není často deglykosylace úplná. Alternativou pro deglykosylaci je působení trifluormethansulfonové kyseliny, které ponechává aminokyselinový skelet glykoproteinu, avšak zcela ničí všechny sacharidové komponenty. U *N*-glykosidicky vázaných struktur zůstává připojen pouze první *N*-acetylglukosamin<sup>38</sup>. Další možností je selektivní *O*-deglyko-

sylace v alkalickém prostředí hydroxidu amonného, uhličitanu amonného nebo hydroxidu sodného v koncentraci do 0,1 M. Reakce (jedná se o  $\beta$ -eliminaci) probíhá za teplot kolem 50 °C po dobu 10–18 h. Jelikož samotná eliminace by vedla k degradaci uvolněných glykanů (tzv. peeling), přidává se do reakce borohydrid sodný, který z uvolněných glykanů tvoří alditoly<sup>39</sup>. Pokud má být  $\beta$ -eliminace použita také pro uvolnění *N*-vázaných glykanů, používá se 1 M hydroxid a teploty kolem 100 °C. Je však třeba dodat, že chemické deglykosylace vždy vyžadují velká množství vzorku a optimalizaci reakčních podmínek pro daný glyko-protein.

## 7. Nalezení glykosylačních míst a určení typu glykanu

Pro nalezení glykosylačních míst existuje řada různých strategií. Základem je identifikace všech teoreticky možných *N*-glykosylačních míst v dané proteinové sekvenci<sup>40</sup> a dále pokus o nalezení potenciálních *O*-glykosylačních míst<sup>41–43</sup>. Klasická strategie spočívá v deglykosylaci PNGasou F a využití přeměny asparaginu nesoucího *N*-vázaný glykan na aspartát. Deglykosylovaný protein je následně štěpen proteasou Asp-N, která působí na *N*-konci kyseliny asparagové. Jelikož enzymová deglykosylace vnesla do sekvence nová zásahová místa pro tuto proteasu, objevíme ve spektrech deglykosylovaného proteinu nové peptidy. Pro jejich snazší identifikaci lze využít deglykosylaci ve směsi normální vody a vody obohacené o kyslík



Obr. 5. Detail isotopové obálky isotopicky neznačeného (plná čára) a značeného (tečkovaná čára) peptidu při enzymové deglykosylaci; jde o deglykosylaci PNGasou F ve směsi  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  a  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  (30:70). Charakteristický isotopový profil (posun  $m/z$  o 2 hmotnostní jednotky) dovoluje jednoznačně identifikovat peptidy, které původně nesly *N*-vázaný oligosacharid

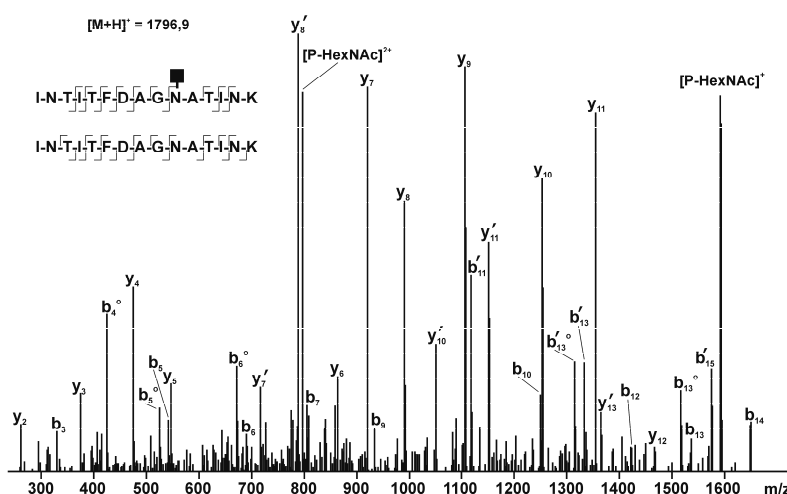
$^{18}\text{O}$  (směs by měla obsahovat minimálně 50 %  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ). Jelikož se při deglykosylaci na asparagin přenáší hydroxyskupina z reakčního prostředí, inkorporuje se  $^{16}\text{OH}$  i  $^{18}\text{OH}$ . To se následně v hmotnostních spektrech projeví na isotopové obálce daného peptidu (obr. 5, cit.<sup>26,44</sup>).

Nalezení všech *N*-glykosylačních míst však většinou není otázkou jednoho pokusu, a tak je třeba kombinovat značení  $^{18}\text{O}$  spolu se štěpením několika různými proteasami (trypsin, chymotrypsin, Asp-N, Glu-C, atd.) a měřením jak peptidových map, tak kolizních spekter peptidů. Při použití endoglykosidas H nebo F nám zůstává kotevní *N*-acetylglukosamin připojený na daný peptid. Z kolizních spekter pak můžeme přesně identifikovat, na kterém asparaginu je glykan připojen (obr. 6).

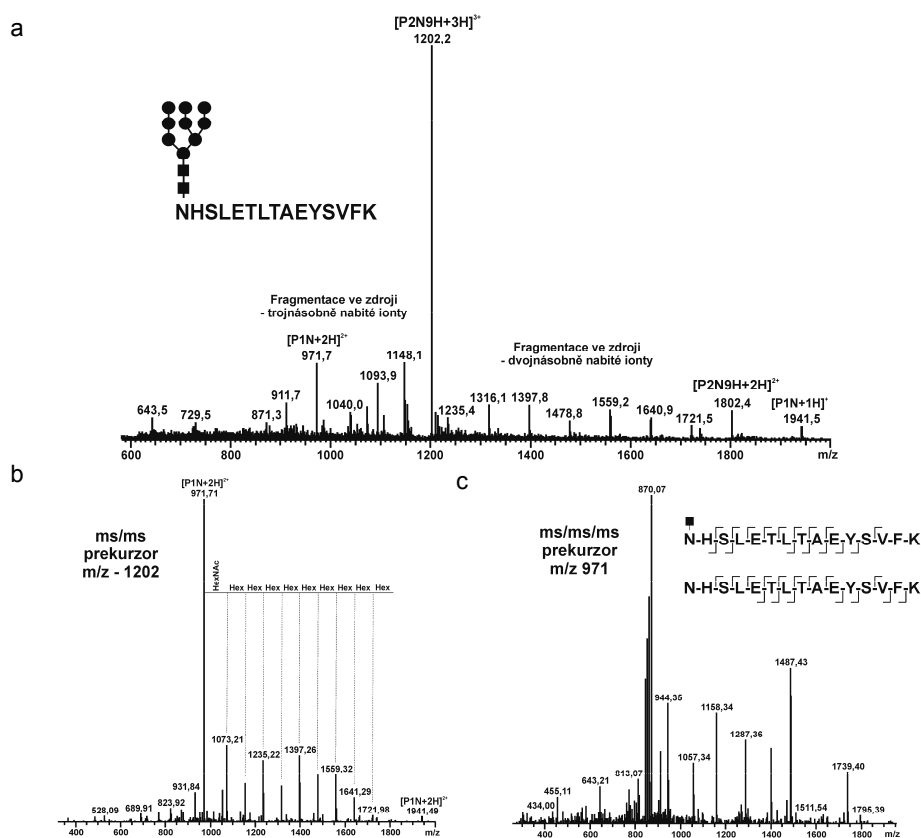
S rozvojem nových hmotnostně spektrometrických technik si můžeme dovolit hledat glykosylační místa i na celém glykosylovaném proteinu. Protein je nejprve štěpen vybranou proteasou a z naměřených celých hmotností glykopeptidů nebo jejich kolizních spekter můžeme nejen identifikovat, zda je dané místo glykosylováno, ale rovnou určujeme, jaký typ oligosacharidu je na jednotlivých místech připojen. Navíc ještě získáváme informaci o mikroheterogenitě daného glykosylačního místa (výskyt různých forem určitého typu oligosacharidu). Pro identifikaci na základě celých hmot je vhodná technika MALDI-TOF, avšak nejlepších výsledků lze dosáhnout při spojení mikrokapilární HPLC s iontovou cyklotronovou rezonancí, kde dosahuje přesnosti měření pod 1 ppm a identifikace jsou tak zcela jednoznačné. Pro interpretaci spekter směsí peptidů a glykopeptidů je vhodné využít specializované software, které glykopeptidy snadno a rychle identifikují<sup>45,46</sup>. Při využití ionizace MALDI se jako nejvhodnější matrice doporučují DHB a HCCA pro glykopeptidy bez náboje a THAP pro glykopeptidy obsahující negativně nabitou skupinu (kyselina sialová, sulfát).

Pro měření kolizních spekter je nejčastěji využíváno spojení mikrokapilární HPLC s iontovou pastí nebo s hmotnostním spektrometrem q-TOF. Výhodou q-TOF je možnost selektivní detekce glykopeptidů. Na instrumentu (operujícím v LC-MS/MS módu) je nastavena jenná fragmentace ve zdroji (dochází k disociaci monosacharidových jednotek) a pokud jsou detegovány diagnostické ionty (např. o  $m/z$  204, 292, 366), jsou provedeny MS/MS experimenty s glykopeptidy, které se právě eluují z kolony a jsou původci zmiňovaných ztrát monosacharidů<sup>47</sup>. Na iontové pastí lze tento experiment provést dvěma způsoby. První vychází z faktu, že drobná štěpení se ve zdroji objeví i za normálních podmínek a navíc, že iontová past je velmi rychle skenující instrument. Bez problémů pak naměříme MS/MS spektra ze všech fragmentů vzniklých ve zdroji. Z glykopeptidů obsahujících vysoký počet sacharidových jednotek získáme informaci o typu připojené struktury a ze štěpení peptidu nesoucího pouze prvou sacharidovou jednotku určíme pozici, ve které je sacharid připojen (obr. 7).

Druhý způsob využívá následné fragmentace, kdy v prvním MS/MS je štěpen celý glykopeptid a v následných kolizních experimentech ( $\text{MS}^3$  – MS/MS/



Obr. 6. Kolizní spektrum peptidu nesoucího *N*-vázaný *N*-acetylhexosamin; ve spektru jsou označeny *b*- a *y*-ionty vzniklé fragmentací peptidových vazeb. Ve spektru vidíme jak ionty nesoucí sacharid, tak ionty, které jej ztratily (označeny čárkou). Kroužek označuje ionty vzniklé z příslušného štěpného iontu ztrátou vody. Na sekvencích peptidu v levé horní části obrázku jsou vyznačena místa štěpení. P – peptid. Spektrum bylo naměřeno na kvadrupólové iontové pasti



Obr. 7. Analýza glykopeptidů tandemovou hmotnostní spektrometrií; a) ESI-MS spektrum glykopeptidu nesoucího strukturu s vysokým obsahem mannosy - schematicky znázorněno v levé části panelu; symboly vysvětleny v obr. 1. Hlavní pík náleží trojnásobně nabitému iontu. Dále jsou ve spektru vidět fragmenty vzniklé ve zdroji. b) MS/MS spektrum z glykopeptidu znázorněného v levé části panelu a). V kolizním spektru vidíme fragmentaci glykosidických vazeb, zcela chybí štěpení vazeb peptidových. Z daného spektra lze vyčíst informaci o typu oligosacharidové struktury. c) Štěpení třetího stupně z hlavního iontu MS/MS spektra uvedeného v panelu b). Jde v podstatě o  $MS^3$  experiment. Z tohoto spektra lze již určit aminokyselinovou sekvenci peptidu a také lokalizovat místo *N*-glykosylace. Prekurzorem je peptid nesoucí pouze kotevní *N*-acetylhexosamin. Na sekvencích v pravé části panelu c) jsou vyznačena místa štěpení

MS) jsou fragmentovány vybrané štěpné ionty naměřené v MS/MS experimentu. Nejlépe se tento typ experimentu provádí na lineární iontové pasti, která se vyznačuje vysokou citlivostí v MS<sup>n</sup> módu a má ještě rychlejší sken než kvadrupólová iontová past. Poměrně nová instrumentace kombinující kvadrupólovou iontovou past s ionizací TOF a MALDI se pak vyznačuje specifickou vlastností, že již v MS/MS spektru glykopeptidu nalezneme štěpné ionty odpovídající fragmentaci jak sacharidové složky, tak i peptidových vazeb<sup>41</sup>. Všechny výše uvedené techniky jsou snadno aplikovatelné na glykopeptidy s *N*-vázanými glykany. Pokud však máme nalézt *O*-glykosylační místa, dostáváme se do oblasti, která již tak triviální není. Jeden způsob spočívá v rozštěpení proteinu bromkyanem (štěpí za methioninem) a následném Edmanově odbourávání získaných štěpů. V místě, kde je glykosylovaný serin nebo threonin, chybí signál pro fenylthiohydantoinový (PTH) derivát dané aminokyseliny, a glykosylovaná PTH-aminokyselina protéká na začátku gradientové eluce, téměř v mrtvém objemu<sup>49</sup>. Využití iontové pasti nebo q-TOF pro identifikaci míst *O*-glykosylace je možné, i když identifikace *O*-glykosylačních míst v peptidech, kde se nalézá více než jedno místo, je značně obtížná. Místo toho je možno využít elegantní řešení, které nabízí kombinace disociačních technik dostupných na spektrometrech s iontovou cyklotronovou rezonancí. Jde o disociace infračerveným laserem (IRMPD), která poskytuje podstatě stejné výsledky jako klasická kolizně indukovaná disociace, je však možno ji nastavit tak, že probíhá pouze selektivní fragmentace glykosidových vazeb, zatímco peptidové vazby zůstávají nedotčeny. IRMPD tak lze využít k určení typu glykanu, který je k danému glykopeptidu připojen. Druhá technika, disociace záchytem elektronu (ECD), pak zcela selektivně fragmentuje pouze peptidové vazby a ponechává glykosyl nedotčen. Z ECD spekter lze poté jednoznačně identifikovat pozice, které byly glykosylovány<sup>50–52</sup>. Na FT-ICR přístrojích vybavených navíc předřazeným kvadrupólem lze provést alternativu této metodiky, a to kombinací kolizně indukovaného štěpení s různými energiemi a ECD.

Výše uvedené postupy v sobě kombinují nalezení glykosylačních míst a přibližné určení typu oligosacharidové struktury. Pro přesný a detailní popis glykanu je však nutno použít jiných technik. V první řadě je nutno glykan odštěpit a zbavit proteinové komponenty. S čistým oligosacharidem je možno provádět celou řadu analýz:

- fluorescenční značení následované chromatografií (HPLC), kapilární elektroforézou (CE) nebo gelovou elektroforézou (PAGE),
- vysokoučinnou iontově výměnnou chromatografií na aniontovém měničích spojenou s pulsní amperometrickou detekcí (HPAEC-PAD),
- postupné odštěpování s použitím exoglykosidas a měření MS,
- permethylaci následovanou MS a MS/MS analýzou,
- MS a MS/MS analýzy nederivatizovaných oligosacharidů,

– nukleární magnetickou rezonancí.

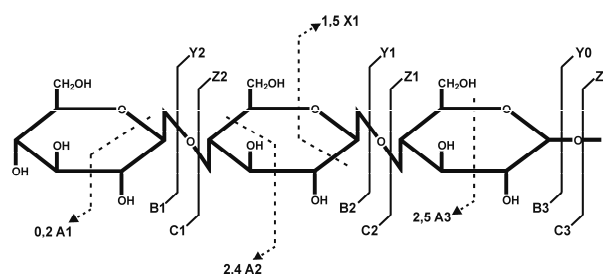
Musíme však poznamenat, že vzhledem ke striktně daným pravidlům pro biosyntézu *N*-vázaných sacharidů, není mnohdy nezbytně nutné znát přesnou strukturu glykanu. Platí totiž jednoduché pravidlo, že čím více se o určité glykosylaci chceme dozvědět, tím více musíme připravit daného glykoproteinu.

Princip fluorescenčního značení a následné separace (HPLC, CE, PAGE) spočívá v modifikaci oligosacharidů, jejich rozdělení a porovnání se známými standardy. Jako fluorescenční značky mohou sloužit např. kyselina 2-amino-benzoová (2-AA) nebo kyselina 8-aminonafalen-1,3,6-trisulfonová (ANTS).

Technika kapalinné chromatografie na anexech s pulsní amperometrickou detekcí (HPAEC-PAD) velmi účinně separuje sacharidy v alkalickém prostředí a dokáže rozdělit glykany nejen podle různého obsahu jednotlivých sacharidů, ale také odlišného větvení. Pro identifikaci se zde opět využívá porovnání se standardy. Výhodou jak fluorescenčního značení s HPLC, tak i HPAEC-PAD je možnost poměrně přesné kvantifikace separovaných glykanů.

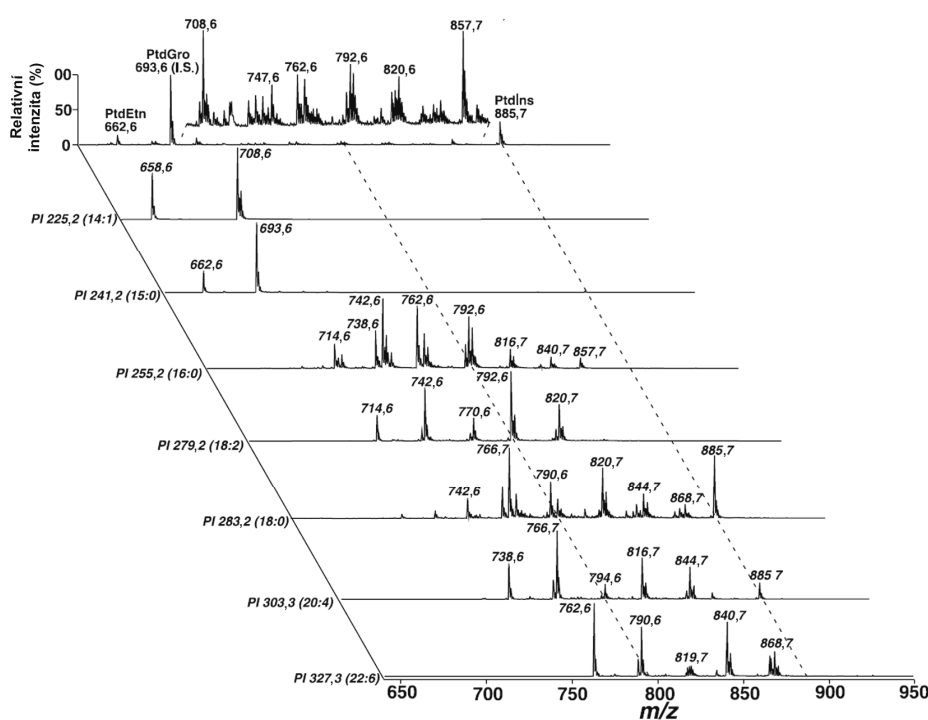
Při postupném odštěpování s použitím exoglykosidas je vhodné začít s izolovaným a přečištěným oligosacharidem. Volbou exoglykosidas s různou specifitou a měřením MS zjišťujeme, jak jsou jednotlivé monosacharidové jednotky spojeny a postupně oligosacharid odbouráváme<sup>53,54</sup>. Při využití kombinace derivatizace následované analýzou MS zjistíme nejen jaká je molekulová hmotnost oligosacharidu, ale získáme také detailní informaci o větvení. Derivatizace (permethylace) se provádí methyljodidem v dimethylsulfoxidu za přítomnosti NaOH. Hlavním důvodem pro derivatizaci je zajištění stability při ionizaci tvrdými ionizačními technikami a druhým důvodem je umožnit vyčíst z MS/MS spekter informaci o větvení. Při štěpení oligosacharidy nejčastěji praskají v místě glykosidové vazby (fragmenty B a Y) (obr. 8, cit.<sup>55</sup>). Toto štěpení však není dostatečně informativní a nejzajímavější z hlediska strukturního jsou tzv. fragmentace přes kruh (obr. 8). Ty vznikají buď při vysokoenergetických štěpeních nebo při ionizaci rychlými atomy (FAB)<sup>56</sup>.

V mnoha případech je při měření oligosacharidů vhodné provádět analýzu v negativním módu. Glykany



Obr. 8. Schématické znázornění štěpení oligosacharidů; názvy iontů podle Domon a Costello. Nejčastější je tvorba iontů B a Y. Nejvíce informativní jsou fragmentace přes kruh – vznikají ionty A a X





Obr. 9. Příklad úplné lipidomické analýzy pro cholinové fosfolipidy<sup>71</sup>; v horní části obrázku je sumární spektrum, v drahách fosfolipidy s různými mastnými kyselinami

nesoucí záporně nabitou skupinu se zde mnohem lépe ionizují a i u neutrálních oligosacharidů mnohdy dostaneme informativnější rozpadová spektra než v módu pozitivním<sup>57–60</sup>. V pozitivním módu se oligosacharidy převážně nabíjejí nikoliv protonací, ale ionty alkalických kovů. Nejintenzivnější signál dostáváme pro molekulu modifikovanou sodíkem a druhý nejintenzivnější signál pro molekulu modifikovanou draslíkem. U glykanů s negativní skupinou můžeme naměřit i sodnou sůl daného sacharidu, která je navíc nabitá sodíkem. Z těchto důvodů je mnohdy obtížné určit, jaká je skutečná molekulová hmotnost analyzovaného sacharidu, a proto se používá kationizace lithiovými ionty. Lithné ionty (ve formě hydroxidu lithného) se přidávají v koncentraci od 0,5 do 5 mmol l<sup>-1</sup>. Vyšší koncentrace již působí nežádoucí potlačení signálu. Optimální koncentrace kolem 1 mmol l<sup>-1</sup> nezaručí, že glykany naměříme pouze jako lithiované, avšak silně oslabí signál molekul modifikovaných sodíkem a téměř zcela potlačí signál molekul modifikovaných draslíkem. Hojně se využívají i další způsoby kationizace, a to zejména při kolizních experimentech, kdy je cílem dosáhnout selektivní tvorby určitých diagnostických štěpných iontů (přidávky iontů Cs<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>)<sup>61,62</sup>. Zatímco kationizace se používá pro analýzy v pozitivním módu, přidávky aniontů (např. Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) jsou využívány pro měření v módu negativním a pro podpoření tvorby diagnostických fragmentů v MS/MS spektrech<sup>63</sup>.

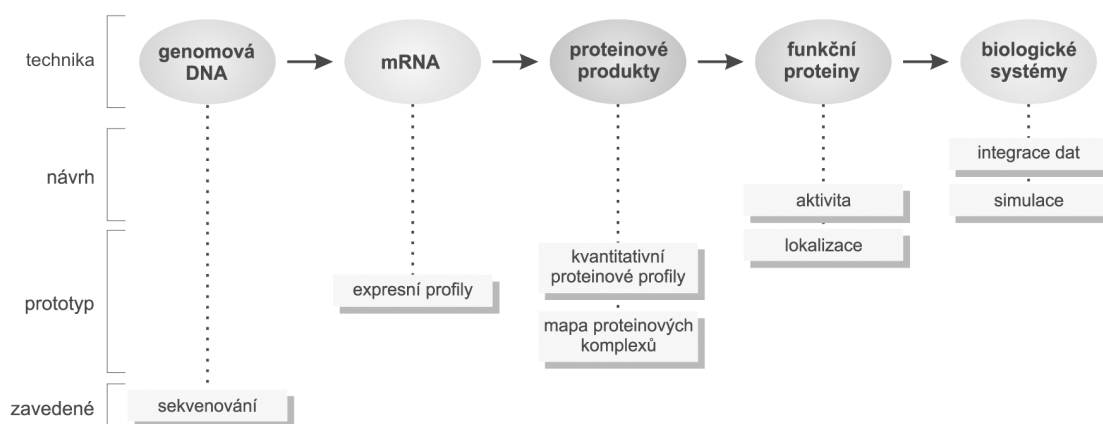
Nejpřímochařejším typem analýzy, který můžeme na oligosacharidových strukturách provádět, je NMR. Ta naprosto bezchybně určí nejen monosacharidové složení,

ale poskytne i detailní informaci o vazbách mezi jednotlivými sacharidy<sup>64</sup>. Nevýhodou však jsou vysoké nároky NMR na čistotu a množství vzorku, kterým je v řadě případů obtížné vyhovět.

Pro analýzu složitých směsí oligosacharidů je možno také využít spojení HPLC-MS. Pro chromatografii se nejčastěji využívají kolony naplněné normální fází (aminové nebo diolové kolony). Je třeba uvážit, že oligosacharidy s redukující skupinou se mohou na amino kolonu částečně chemicky vázat, proto je upřednostňována kolona diolová. Velmi populární jsou také nosiče na bázi porezního aktivního uhlí<sup>65,66</sup>.

## 8. Lipidomika

Veškeré metodické přístupy eukaryotické proteomiky jsou založené na analýzách přírodních látek hydrofilní povahy, ať již jde o vlastní proteiny, nebo jejich modifikace nabitými a polárními skupinami, jako jsou fosfáty nebo sacharidy. V komplexních biologických systémech ovšem hrají nezastupitelnou úlohu i nepolární látky typu lipidů. V proteomice se s nimi setkáváme zejména jako se substituenty modifikujícími polypeptidové řetězce a tím i biologickou aktivitu proteinů. Hmotnostní spektrometrie se ukázala jako velmi vhodná metoda pro analýzy těchto modifikací<sup>67</sup>. S lipidy mohou ovšem proteiny být spojeny též nekovalentně – mohou zprostředkovat jejich zakotvení v biologických membránách, a mohou sloužit i jako substráty, jak je tomu u různých enzymů a kofaktorů lipidové-



Obr. 10. Výzkumné směry na cestě k biologii systémů

ho metabolismu. V prvním případě se mohou lipidy stát důležitými separačními nástroji při izolaci určitých proteinových frakcí plnicích v buňce důležité funkce, jako např. u proteinů membránových mikrodomén nezbytných při buněčné signalizaci<sup>68</sup>. Spojení isotopově značených lipidových prekurzorů s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem se stalo v poslední době oblíbeným nástrojem analýzy buněčných lipidomů<sup>69</sup> a sledování metabolismu lipidů včetně detailních studií příslušných enzymů<sup>70</sup>. Lipidomika je nyní používána ve stejném smyslu jako proteomika, tj. jako moderní a účinná metoda pro dokumentování celkových lipidových profilů zdravých a nemocných buněk<sup>71</sup>. Příklad takové analýzy pro cholinové fosfolipidy je uveden na obr. 9.

## 9. Závěr

Eukaryotická genomika, proteomika i glykomika se dnes stává součástí nového, integrujícího směru v biologických vědách označovaného jako biologie systémů. Schéma postupné integrace jednotlivých popisných disciplín do systémové biologie je znázorněno na obr. 10. Tento nový obor je založen na myšlence, že počet jednotlivých komponent biologického systému je vysoký, ale konečný. Shromáždění a integrace dostatečného počtu údajů o expresi jednotlivých proteinů, jejich posttranslačních modifikacích a vzájemných interakcích by tak jednoho dne měly vyústit v integrovaný pohled na biologické systémy a matematickou (počítačovou) simulaci jejich vývoje<sup>1</sup>.

### Seznam zkratk

CE	kapilární elektroforéza (angl. Capillary Electrophoresis)
Endo	endoglykosidasa
ESI	ionizace elektrosprejem (angl. Electrospray Ionization)
FT-ICR	iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

Hex	hexosa
HexNAc	<i>N</i> -acetylhexosamin
HPAEC	kapalinová chromatografie na anexech (angl. High Performance Anion Exchange Chromatography)
MALDI	ionizace laserovým paprskem (angl. Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization)
PAD	pulsní amperometrická detekce
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PNGasa	protein <i>N</i> -glykanasa
TOF	time-of-flight, detekce hmotnosti založená na době letu

*Projekty, při nichž byly získány výše uvedené výsledky, jsou podporovány výzkumným centrem IM4635608802 „Centrum cílených terapeutik“ MŠMT ČR.*

### LITERATURA

- Patterson S. D., Aebersold R. H.: Nat. Genet. Suppl. 33, 311 (2003).
- O'Farrell P. H.: J. Biol. Chem. 250, 4007 (1975).
- <http://www.hupo.org>, 15.3.2005.
- <http://www.EFPS.org>, 15.3.2005.
- Dell A., Morris H. R.: Science 291, 2355 (2001).
- Lai R.: Cancer 95, 1071 (2002).
- Ritchie R. F., Palomaki G. E., Neveux L. M., Navolotskaia O.: J. Clin. Lab. Anal. 13, 280 (1999).
- Uetz P., Giot L., Cagney G., Mansfield T. A.: Nature 403, 623 (2000).
- Link A.J.: Nat. Biotechnol. 17, 676 (1999).
- Rabilloud T.: Proteomics 2, 3 (2002).
- Gorg A.: Electrophoresis 21, 1037 (2000).
- Karas M., Hillenkamp F.: Anal. Chem. 60, 2299 (1988).
- Patterson S. D., Aebersold R.: Electrophoresis 16, 1791 (1995).
- Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M.: Science 246, 64 (1989).

15. Hunt D. F.: *Science* 256, 1817 (1992).
16. Tureček F.: *J. Mass Spectrom.* 37, 1 (2002).
17. McConnell S. J., Hoess R. H.: *J. Mol. Biol.* 250, 460 (1995).
18. Holt L. J., Enever C., de Wildt R. M., Tomlinson I. M.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 445 (2000).
19. Mitchell P. A.: *Nat. Biotechnol.* 20, 225 (2002).
20. Andersen J. S., Lyon C. E., Fox A. H., Mann M.: *Curr. Biol.* 12, 1 (2002).
21. Skop A. R., Liu H., Yates J., Meyer B. J., Heald R.: *Science* 305, 61 (2004).
22. Drickamer K., Taylor M. E.: *Genome Biol.* 3, 1034.1 (2002).
23. Moniaux N., Andrianifahanana M., Brand R. E., Batra S. K.: *Br. J. Cancer* 91, 1633 (2004).
24. Gong C. X., Liu F., Zamfir A., Peter-Katalinic J.: *Electrophoresis* 25, 2649 (2004).
25. Mutoni F., Brockington M., Torelli S., Brown S. C.: *Curr. Opin. Neurol.* 17, 205 (2004).
26. Bařinka C., Šácha P., Sklenář J., Man P., Bezouška K., Slusher B. S., Konvalinka J.: *Protein Sci.* 13, 1627 (2004).
27. Pavlíček J., Sopko B., Ettrich R., Kopecky V. Jr, Baumruk V., Man P., Havlíček V., Vrbacký M., Martínková L., Křen V., Pospíšil M., Bezouška K.: *Biochemistry* 42, 9295 (2003).
28. Voet D., Voet J. G.: *Biochemistry*. Wiley, New York (1990).
29. Kornfeld R., Kornfeld S.: *Annu. Rev. Biochem.* 54, 631 (1985).
30. Moremen K. W.: *Biochem. Biophys. Acta* 1573, 225 (2002).
31. Hounsell E. F., Davies M. J., Renouf D. V.: *Glycoconjugate J.* 13, 19 (1996).
32. Cummings R. D.: *Methods Enzymol.* 230, 66 (1994).
33. Bezouška K., Sklenář J., Novák P., Halada P., Havlíček V., Kraus M., Tichá M., Jonáková V.: *Protein Sci.* 8, 1551 (1999).
34. Denzinger T., Diekmann H., Bruns K., Laessing U., Stuermer C., Przybylski M.: *J. Mass Spectrom.* 34, 435 (1999).
35. Harvey D. J.: *Mass Spectrom. Rev.* 18, 349 (1999).
36. Gates R., Rathbone E., Masterson L., Wright I., Electricwala A.: *Glycoprotein Analysis Manual*. Sigma-Aldrich (2004).
37. Takasaki S., Misuochi T., Kobata A.: *Methods Enzymol.* 83, 263 (1982).
38. Edge A. S.: *Biochem. J.* 376, 239 (2003).
39. Takasaki S., Yamashita K., Kobata A.: *J. Biol. Chem.* 253, 6068 (1978).
40. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>, 15.3.2005.
41. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>, 15.3.2005.
42. <http://www.cbs.dtu.dk/services/DictyOGlyc>, 15.3.2005.
43. <http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang>, 15.3.2005.
44. Gonzales J., Takao T., Hori H., Besada V., Rodriguez R., Padron G., Shimonishi Y.: *Anal. Biochem.* 205, 151 (1992).
45. <http://us.expasy.org/tools/glycomod>, 15.3.2005.
46. <http://www.dkfz.de/spec/glypeps>, 15.3.2005.
47. Sullivan B., Addona T. A., Carr S. A.: *Anal. Chem.* 76, 3112 (2004).
48. Demelbauer U. M., Zehl M., Plematl A., Allmaier G., Rizzi A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 1575 (2004).
49. Gooley A. A., Pisano A., Packer N. H., Ball M., Jones A., Alewood P. F., Redmond J. W., Williams K. L.: *Glycoconjugate J.* 11, 180 (1994).
50. Migorodskaya E., Roepstorff P., Zubarev R. A.: *Anal. Chem.* 71, 4431 (1999).
51. Hakansson K., Cooper H. J., Emmett M. R., Costello C. E., Marshall A. G., Nilsson C. L.: *Anal. Chem.* 73, 4530 (2001).
52. Kjeldsen F., Haselmann K. F., Budnik B. A., Sorensen E. S., Zubarev R. A.: *Anal. Chem.* 75, 2355 (2003).
53. Sutton C. W., Cottrell J. S., v knize: *Newer Methods In Glycoprotein and Glycolipids Characterization* (Cumming, D., Reinhold, V.N., ed.). Academic Press, London 1994.
54. Sutton C. W., O'Neil J. A., Cottrell J. S.: *Anal. Biochem.* 218, 34 (1994).
55. Domon B., Costello C. E.: *Glycoconjugate J.* 5, 397 (1988).
56. Dell A., Reason A. J., Khoo K. H., Panico M., McDowell R. A., Morris H. R.: *Methods Enzymol.* 230, 108 (1994).
57. Talbo G., Mann M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 100 (1996).
58. Bacher G., Korner R., Atrih A., Foster S. J., Roepstorff P., Allmaier G.: *J. Mass Spectrom.* 36, 124 (2001).
59. Čmelík R., Štikařovská M., Chmelík J.: *J. Mass Spectrom.* 39, 1467 (2004).
60. Robbe C., Capon C., Coddeville B., Michalski J. C.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 412 (2004).
61. Harvey D. J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 484 (2005).
62. Harvey D. J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 926 (2001).
63. Jiang Y., Cole R. B.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16, 60 (2005).
64. Hricovini M.: *Curr. Med. Chem.* 11, 2526 (2004).
65. Karlsson N. G., Packer N. H.: *Anal. Biochem.* 305, 173 (2002).
66. Karlsson N. G., Wilson N. L., Wirth H. J., Dawes P., Joshi H., Packer N. H.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 2282 (2004).
67. Havlíček V., Higgins L., Chan W., Halada P., Šebo P., Sakamoto H., Hackett M.: *J. Mass Spectrom.* 36, 384 (2001).
68. Man P., Novák P., Cebeauer M., Horváth O., Fišerová A., Havlíček V., Bezouška K.: *Proteomics* 5, 113 (2005).
69. Hunt A. N., Clark G. T., Attard G. S., Postle A. D.: *J. Biol. Chem.* 276, 8492 (2001).
70. Hunt A. N., Alb J. G., Koster G., Postle A. D., Ban-

kaitis V. A.: *Biochem. Soc. Trans.* 32, 1063 (2004).

71. Han X., Yang J., Cheng H., Ye H., Gross R. W.: *Anal. Biochem.* 330, 317 (2004).

**P. Man<sup>a</sup> and K. Bezouška<sup>a,b</sup>** (<sup>a</sup> *Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic,* <sup>b</sup> *Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Praha, Czech Republic*): **Recent Trends in Eukaryotic Proteomics, Glycomics, and Lipidomics**

An enormous complexity of eukaryotic proteomes, in which tens of thousands of different genes give rise to

millions of protein products, brings about new demands and challenges on the sensitivity, dynamic range, and robustness of analytical approaches employed for their analysis. The technologies behind the modern proteomics of eukaryotes rely on a combination of microscale separation techniques and powerful detection methods, first of all by mass spectrometry. Analysis of other classes of natural compounds such as carbohydrates or lipids requires the development of innovative strategies several of which are described in this review. The analytical methods resulted in the acquisition of a wealth of information that needs to be sorted, presented, and cataloged using modern tools of current bioinformatics.