

## PROTEOMIKA W BADANIU DROBNOUSTROJÓW

Ewa Szczepańska, Małgorzata Robak

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Streszczenie.** We wstępie do artykułu przedstawiono stosunkowo nową dziedzinę badań – proteomikę, w obrębie której analizowane są: skład, budowa i funkcja białek oraz zachodzące pomiędzy nimi interakcje. W kolejnych rozdziałach opisano najważniejsze techniki analityczne proteomiki: elektroforezę dwukierunkową, metodę laserowej desorpcji/ionizacji próbki wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu (MALDI-TOF) oraz elektrozpraszanie jonizacyjne (ESI, *electrospray ionization*). W celu przybliżenia zagadnień związanych z proteomiką w opracowaniu zaprezentowano przykłady analizy proteomu drobnoustrojów, w tym wybranych patogenów (*Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium avium*, *Borrelia* ssp., *Aspergillus flavus*). Na podstawie wyników badań proteomu udokumentowano możliwość identyfikacji gatunku oraz badanie metabolizmu mikroorganizmu i interakcji gospodarz-patogen, a nawet możliwość różnicowania potencjału enzymatycznego mikroorganizmów utylizujących surowce ligni-nocelulozowe. W podsumowaniu zaznaczono potencjał analizy proteomicznej, przydatnej w wielostronnej charakterystyce drobnoustrojów.

**Słowa kluczowe:** proteom drobnoustrojów, MALDI-TOF, identyfikacja patogenów

### WSTĘP

Proteomika to dyscyplina, w obrębie której zajmujemy się badaniem składu, budowy i funkcji białek oraz zależności między wszystkimi białkami znajdującymi się w komórkach, tkankach bądź organizmach. Zestaw białek występujących w komórce, kodowany przez genom, określa się mianem proteomu [Drabik, Silberring 2010a]. Opublikowana w 1975 roku przez Patricka O'Farrella procedura separacji białek *Escherichia coli* za pomocą elektroforezy dwukierunkowej w żelu poliakrylamidowym stanowiła narodziny proteomiki [O'Farrel 1975, Neidhardt 2011]. Termin ten został użyty po raz pierwszy w 1994 roku przez profesora Marca Wilkinsa podczas konferencji w Sienie [Dmitrzak-Węglarz, Hauser 2006].

---

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author: Małgorzata Robak, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław, e-mail: malgorzata.robak@up.wroc.pl

W przeciwieństwie do genomu skład białek często ulega zmianom w przestrzeni i czasie oraz zależy od typu komórki i fazy rozwoju. Proteom zmienia się również w odpowiedzi na różne czynniki środowiska: skład pożywki, temperatura hodowli, pH, natlenienie, obecność antybiotyków i czynników wzrostu.

Głównym celem proteomiki jest wykrycie biomarkerów. Może to być jedno białko, a nawet cały zmieniony profil białkowy, który będzie powtarzalny oraz charakterystyczny dla danego organizmu [Wery 2007]. Markery umożliwiają znacznie szybszą analizę komórek i zdecydowanie ją ułatwiają. Proteomika to stosunkowo nowa dziedzina, rozwijająca się dynamicznie, o dużym potencjale poznawczym, której wyniki będą leżały u podstaw molekularnej diagnozy oraz identyfikacji komórek i mikroorganizmów. W celu przybliżenia zagadnień związanych z proteomiką i proteomem w opracowaniu zaprezentowano zakres badań oraz techniki najczęściej stosowane podczas analizy proteomicznej. W pracy opisano badania dotyczące proteomu bakterii: *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium avium* z rodzaju *Borrelia* oraz grzybów strzępkowych *Aspergillus flavus* i mikroorganizmów utylizujących surowce ligninocelulozowe.

## PROTEOMIKA

Obecnie wyróżniamy trzy zakresy proteomiki: strukturalną, funkcjonalną oraz ilościową [Drabik, Silberring 2010b]. W zakresie proteomiki strukturalnej podejmujemy działania mające na celu określenie struktury przestrzennej białka, wykorzystując informacje biochemiczne powiązane z naukami, w których prowadzone są badania nad strukturą przestrzenną białek i kwasów nukleinowych (np. krystalografia makrocząsteczek, mikroskopia elektronowa, metody spektroskopowe). Bardzo przydatne okazały się programy komputerowe, umożliwiające użycie sekwencji aminokwasów do określenia struktury przestrzennej białek [Bujacz, Bujacz 2010]. Portale takie jak PMP (Protein Model Portal, <http://www.proteinmodelportal.org/>) ułatwiają dostęp do różnych modeli białek stworzonych przez porównawcze metody modelowania, dostarczone przez różne witryny partnerskie.

W zakresie proteomiki funkcjonalnej badamy oddziaływania między białkami, dynamikę powstawania i rozpadu kompleksów białkowych, prowadzimy eksperymenty umożliwiające identyfikację i ustalenia ilościowe oddziałujących białek. W tym zakresie proteomiki sprawdzana jest także zmienność aktywności oraz funkcji biologicznej białka w zależności od oddziaływań z innymi białkami. Funkcję białka można określić również poprzez wyłączenie jego ekspresji oraz zbadanie jaki wpływ wywiera jego brak na dany organizm [Bodzoń-Kuśkowska 2010]. Obecnie badania te stanowią podstawę tak zwanej biologii systemów [Weston, Hood 2004].

W zakresie proteomiki ilościowej podejmujemy badania sprawdzające w jaki sposób zmienia się stężenie białka w komórce w wyniku oddziaływania określonych czynników zewnętrznych [Noga 2010]. Analiza ilościowa oparta jest głównie na porównaniu intensywności wybarwionych „plamek” białek powstałych w elektroforezie 2-DE. Intensywność ta jest proporcjonalna do ilości białka w nich zawartych. W typowych eksperymentach porównywane są obrazy żeli, które pochodzą z rozdziału białek tej samej komórki w różnych stanach. Najczęściej porównywana jest próba kontrolna z próbą, która została

poddana działaniu określonych czynników. Stężenie białka można określić również poprzez znakowanie specjalnym znacznikiem (strategia ICAT z ang. *isotope-coded affinity tags*). Tego typu oznaczenia przyczyniają się do opracowania biomarkerów. Wykrycie zmian ilości poszczególnych białek nie zawsze jest jednoznaczne z odkryciem nowego biomarkera. Wyniki należy poddać kolejnym weryfikacjom.

## NAJWAŻNIEJSZE TECHNIKI ANALITYCZNE PROTEOMIKI

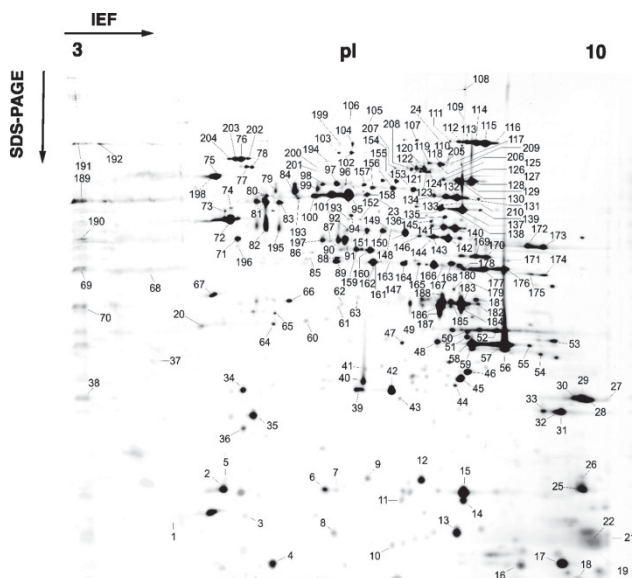
Techniki stosowane w analizie proteomicznej polegają na procedurach oczyszczania i separacji poszczególnych białek zawartych w próbce oraz ich identyfikacji, a nawet identyfikacji potencjalnych biomarkerów [Kraj i in. 2010]. Metody te obejmują przede wszystkim elektroforezę dwuwymiarową białek zawartych w próbce, wycięcie poszczególnych protein i ich analizę (po odpowiednim przygotowaniu, np. trawieniu trypsyną) metodą MALDI-TOF (z ang. *matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight*) oraz ESI (z ang. *electrospray ionization*).

**Elektroforeza dwuwymiarowa** – jej wykonanie pozwala na jednoczesną separację tysięcy białek. Pierwszym wymiarem elektroforezy dwukierunkowej jest ogniskowanie izoelektryczne, czyli rozdział względem gradientu pH. Najczęściej odbywa się przy użyciu pasków do izoelektrycznego ogniskowania IPG (z ang. *immobilized pH gradient*), które tworzą stabilny gradient pH poprzez przyłączenie cząsteczek amfolitów do akrylamidu. Białka wprowadzone do żelu poliakrylamidowego migrują i zatrzymują się w momencie dotarcia do pH swoistego dla ich punktu izoelektrycznego. W ten sposób uzyskuje się rozdział białek zgodnie z wartościami pI. Następnie, w drugim wymiarze elektroforezy, rozdzielone przez różną wartość pI białka separuje się ze względu na ich masę cząsteczkową w warunkach denaturujących z siarczanem dodecylu sodu (SDS). W celu uwidocznienia białek w żelu stosuje się najczęściej barwienie srebrem lub barwnikiem Coomassie Brilliant Blue. Ostatnim etapem jest przeprowadzenie komputerowej analizy obrazów uzyskanych żeli [Drabik, Bodzoń-Kuślakowska 2010, Suchwałko, Podbielska 2010]. Przykładowy obraz rozdzielonych białek mitochondrialnych *Saccharomyces cerevisiae* przedstawiono na rysunku 1.

**MALDI-TOF** – metoda laserowej desorpcji/ionizacji próbki wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu jest jedną z najczęściej stosowanych metod jonizacji w spektrometrii mas, która wykorzystywana jest do badań białek [Yergey i in. 2002]. W metodzie tej próbkę miesza się z matrycą, która absorbuje promieniowanie skierowanego na nią lasera, przez co ulega jonizacji, a następnie zostają zjonizowane cząsteczki próby, czego wynikiem jest ich desorpcja z powierzchni płytki. Dalsza jonizacja cząsteczek następuje w wyniku zderzeń tych cząstek z fotowzbudzoną matrycą i po kilkuset nanosekundach zdesorbowane jony kierowane są do analizatora [de Hoffman, Stroobant 2013].

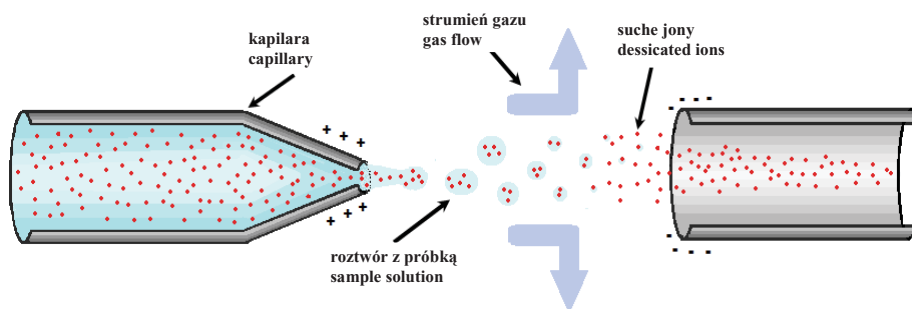
**ESI (*electrospray ionization*)** – elektrorozpraszanie jest obok techniki MALDI najczęściej stosowaną metodą jonizacji cząsteczek w celu analizy. Metoda ta jest skuteczna szczególnie w przypadku analizy prób zawierających substancje o dużych wartościach masy cząsteczkowej, np. białek. Urządzenie do ESI zbudowane jest z dwóch kapilar (rys. 2). Do pierwszej wprowadzany jest roztwór z analizowanymi białkami, który został zjonizowany poprzez wstępne przygotowanie roztworu. Przy wylocie tej kapilary stru-

mień gazu rozrywa ciecż, która opuszcza kapilarę w postaci chmury kropelek. Różnica potencjałów występująca między kapilarami sięgająca do 5,0 kV sprawia, że kropelki trafiają do obszaru pola elektrycznego. Do drugiej kapilary trafiają „suche jony” powstałe w wyniku całkowitego odparowania z powierzchni kropelek rozpuszczalnika podczas przelotu. Następnie próbka trafia w celu dalszej analizy do detektora spektrometru [Kerbarle, Verkerk 2011].



Rys. 1. Rozdział białek mitochondrialnych drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w elektroforezie dwukierunkowej w żelu poliakrylamidowym (2-DGE). Najpierw przeprowadzono izoelektryczne denaturującą (IEF) białek mitochondrialnych, a potem elektroforezę w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) <http://www.pnas.org/content/100/23/13207/F2.e-expansion.html>

Fig. 1. Separation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial proteins by 2-DGE. Isolated mitochondrial proteins were subjected to isoelectric focusing (IEF), followed by SDS-PAGE



Rys. 2. Działanie źródła jonów typu *electrospray* [opracowano na podstawie Suder 2010]

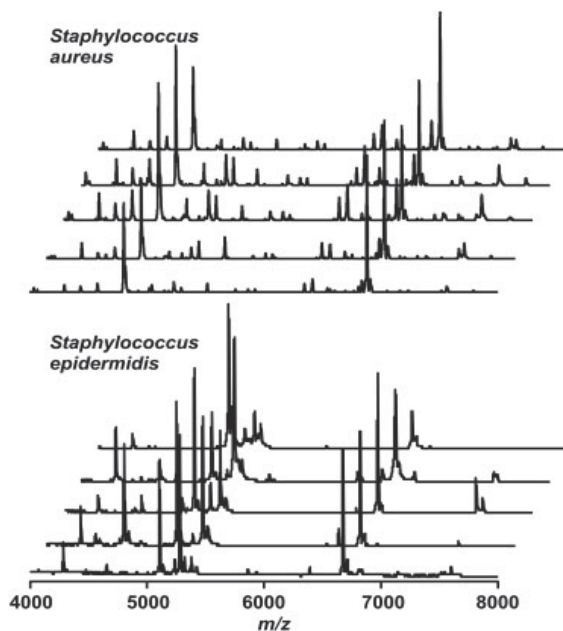
Fig. 2. Operation of electrospray ionization [according to Suder 2010]

## PRZYKŁADY BADANIA PROTEOMU DROBNOUSTROJÓW

Techniki identyfikacji proteomu najczęściej wykorzystywane są w celach medycznych takich jak diagnostyka chorób i zbadanie ich molekularnych przyczyn, tworzenie skutecznych leków czy też dopasowanie metody leczenia do konkretnego organizmu i śledzenie jej skuteczności, szczególnie w przypadku chorób nowotworowych [Tomaszewska i in. 2005]. Bardzo istotnym zastosowaniem proteomiki jest również badanie mikroorganizmów. Badania można prowadzić w kierunku identyfikacji szczepów drobnoustrojów, analizy białek, poszukiwaniu czynników warunkujących patogenność i oddziaływań z gospodarzem.

### Zastosowanie proteomiki w celu identyfikacji mikroorganizmów

Proteomiczna identyfikacja mikroorganizmów polega na przypisaniu „próbki” wyizolowanej z badanego materiału do referencyjnego gatunku, który został wcześniej zdefiniowany w analizie proteomicznej w określonych warunkach [Welker 2011]. Procedura ta ma wadę ze względu na stosunkowo małą liczbę opisanych drobnoustrojów w porównaniu z ilością gatunków, które występują na ziemi. Istotną przeszkodą jest też fakt, że proteom jest zróżnicowany w zależności od warunków w jakich znajduje się badany drobnoustrój. W związku z tym powstają wątpliwości, czy różnice i podobieństwa widm masowych próbek wynikają z przyjętej taksonomii bądź zmian metabolicznych ze względu na warunki hodowli. Niemniej, podobnie jak odcisk DNA (*DNA fingerprint*) umożliwia identyfikację organizmu, tak można dążyć do uzyskania białkowych odcisków (*protein fingerprint*) warunkujących również poprawną identyfikację. Najbardziej odpowiednią metodą analizy proteomu w celu określania drobnoustrojów jest MALDI-TOF. Kryterium jakie musi spełniać identyfikacja metodą białkowych „odcisków palców” to powtarzalność wyników uzyskanych z indywidualnych szczepów. Dwa pozostałe warunki niezbędne do wiarygodnej identyfikacji izolatów nieznanymi szczepów to fakt, że różnice widm masowych białkowych „odcisków palców” przedstawicieli różnych gatunków muszą być natychmiast widoczne i wcześniej rozpoznane, zaś spokrewnione gatunki powinny mieć kilka wspólnych fragmentów masowych. Przykładem mogą być badania dotyczące siedmiu gatunków, w tym trzech należących do rodziny *Enterobacteriaceae* [Lynn i in. 1999]. Widma masowe zawierały charakterystyczne dla rodziny sygnały ( $m/z$  ~4400, ~5500, ~6200–6500) inne niż otrzymane w pozostałych gatunkach. Należy jednak podkreślić, że fragmenty masowe o podobnej wartości  $m/z$  nie muszą odzwierciedlać tego samego białka. Analizę proteomiczną można także wykorzystać do różnicowania szczepów tego samego gatunku. Na rysunku 3 przedstawiono widma należące do pięciu szczepów *Staphylococcus aureus* i pięciu *Staphylococcus epidermidis*. Wiele sygnałów masowych ma taką samą wartość stosunku  $m/z$ , lecz o różnej intensywności, czyli nie są identyczne. Pozwala to na rozróżnienie i typowanie szczepów tego samego gatunku. Zwłaszcza że uzyskane z wyizolowanych próbek widma masowe analizowane są za pomocą specjalnych algorytmów wykrywających reprezentatywne piki, uwzględniających błędy analityczne dotyczące wymiarów i zmienności intensywności pików z powtórzonych wielokrotnie analiz pojedynczych szczepów [Jarman i in. 2000]. Używane są algorytmy rozpoznające próbkę na zasadzie transformacji pojedynczych widm w jednopunktowe wektory w  $n$ -kierunkowej przestrzeni. Z wielokrotnych analiz poszczególnych szczepów zostaje wyznaczona próbka reprezentująca daną populację, która używana jest jako identyfikator dla nieznanymi prób [Bright i in. 2002].



Rys. 3. Widma masowe pięciu różnych szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis* [wg Welker 2011]  
 Fig. 3. Mass spectra of five different strains of *S. aureus* and *S. epidermidis* [according to Welker 2011]

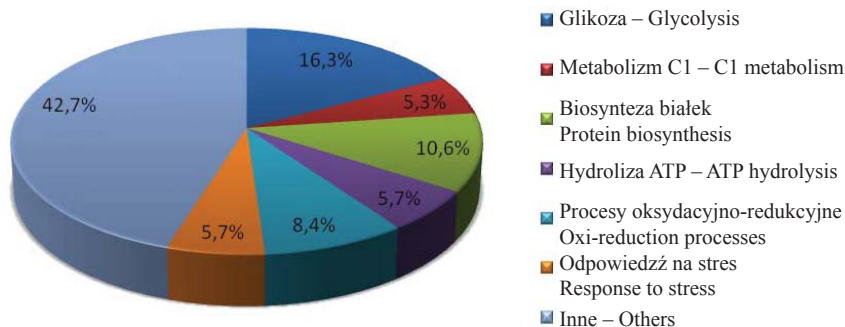
### Badanie proteomu bakterii chorobotwórczych

#### *Staphylococcus aureus*

Szczepy określane jako MRSA, czyli methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, stały się od niedawna jedną z głównych przyczyn infekcji u ludzi. Mikroorganizm ten odpowiada za choroby takie jak zapalenie płuc i opon mózgowych, ostre zapalenie wsierdzia, zapalenie kości i szpiku, powoduje infekcje skórne [Klevens i in. 2007].

Analiza proteomu *S. aureus* ST398 umożliwiła określenie, które białka są odpowiedzialne za wirulencję i odporność na metycylinę [Monteiro i in. 2012]. W elektroforezie dwukierunkowej uzyskano 105 białek o masie cząsteczkowej od 5 do 145 kDa. Białka te wycięto z żelu i poddano dalszej analizie w spektrometrii masowej MALDI-TOF. Ostatecznie wykazano, że większość z nich jest związana z procesami glikolizy, biosyntezy białek, procesami oksydacyjno-redukcyjnymi, odpowiedzią na stres, hydrolizą ATP, transportem protonów i metabolizmem związków jednowęglowych (rys. 4). Wszystkie procesy angażujące te białka są niezbędne do normalnego funkcjonowania mikroorganizmu.

Ze 105 białek udało się wyodrębnić pięć odpowiedzialnych za wirulencję i oporność na metycylinę. Zidentyfikowano trzy enzymy: katalazę i dwie dysmutazy ponadtlenkowe, których funkcją jest odpowiedź na stres oksydacyjny spowodowany przez  $H_2O_2$  produkowane przez fagocyty. Zidentyfikowano także białko opiekuńcze (dna K) odpowiedzialne za odporność szczepu na szok cieplny, przyczyniające się również do odporności szczepu na metycylinę. Kolejne zidentyfikowane białko występuje w warstwie peptydoglikanowej błony i zawiera L-alaninę, której obecność zmniejsza powinowactwo antybiotyku z komórkami patogenu.



Rys. 4. Podział białek związanych z procesami biologicznymi u *S. aureus* [opracowano na podstawie Monteiro i in. 2012]

Fig. 4. Distribution of proteins associated with biological processes in *S. aureus* [according to Monteiro et al. 2012]

Tabela 1. Wpływ *agr* i  $\sigma^B$  na ilość wybranych białek związanych z wirulencją [wg Ziebandt i in. 2004]

Table 1. The influence of *agr* and  $\sigma^B$  on the amount of selected proteins associated with virulence [according to Ziebandt et al. 2004]

Białko Protein	Nazwa i funkcja białka Name and function of protein	Wpływ regulatora Response to regulator	
		<i>agr</i>	$\sigma^B$
Aur	Aureolizyna – hamuje fagocytozę i zabijanie bakterii przez neutrofile gospodarza [Laarman i in. 2011]	+	-
	Aureolysine – inhibits phagocytosis and killer activity of hosts neutrophiles [Laarman et al. 2011]		
Lip <sup>F</sup>	Prekursor lipazy triacyloglicerolowej – Triacylglycerol lipase precursor	+	-
Plc	1-fosfatydylinozytol fosfodiesterazy – uczestniczy w lizie błony fagolizosomalnej 1-phosphatidylinositol phosphodiesterase – participe in lysis of phagolysosomal membrane [http://www.drugbank.ca/molecules/5040]	+	-
SplA	Proteaza serynowa – Serine protease	+	-
SspA	Endopeptydaza glutamylowa – Glutamyl endopeptidase	+	-
SspB	Endopeptydaza cysteinowa – ma duże znaczenie w metabolizmie podczas warunków stresowych	+	-
	Cysteine endopeptidase – important in stress conditions metabolism		
Hlb	Hemolizyna $\beta$ – uwalnia żelazo zawarte w hemoglobinie	+	0
	$\beta$ -hemolysin-liberation of iron from hemoglobine [http://wiki.biol.uw.edu.pl/t/img_auth.php/6/68/Hemolizyny_bakteryjne.pdf]		
Sak	Stafylokinaza – hamuje fagocytozę, utrzymuje stan zapalny [Bokarewa i in. 2006]	+	0
Aly	Stafylokinase – inhibits phagocytose and inforce inflammation [Bokarewa et al. 2006]		
	Białko pełniące funkcję podobną do autolizyny Protein of function similar to autolysine	-	+
IsaA	Immunodominujący antygen A – Immunodominant antigen A	-	+
SsaA	Gronkowcowy antygen sekrecyjny – Staphylococcus secretory antigen	-	+
Geh	Hydrolaza estrów glicerolowych – Glycerolesterhydrolase	-	+
Lip	Prekursor lipazy triacyloglicerolowej – Triacylglycerol lipase precursor	0	+

„+” pozytywny wpływ regulatora – positive response to regulator

„0” brak wpływu – without response

„-” negatywny wpływ regulatora – negative response to regulator

Inni badacze analizowali proteom *S. aureus* podczas wzrostu [Ziebandt i in. 2004]. Wykazali znaczącą różnicę w proteogramach próbek pobranych podczas wykładniczej fazy wzrostu komórek i będących w fazie stacjonarnej. Z tego porównania udało się wytypować kilkanaście białek występujących tylko w określonym czasie. Dodatkowo poprzez zestawienie zewnątrzkomórkowych białek produkowanych przez dziki szczep *S. aureus* RN6390 z białkami produkowanymi przez mutantą mającego mutację w miejscu *agr* (*accessory gene regulator*) udało się określić, że obecność *agr* spowodowała zmniejszenie stężenia 15 białek, z jednoczesnym zwiększeniem stężenia 50 innych białek. Przeciwny wpływ na poziom poszczególnych białek miał regulator  $\sigma^B$  – alternatywny czynnik regulujący odpowiedź na stres i geny wirulencji. Ostatecznie wykazano, że białka  $\sigma^B$  i *agr* mają przeciwny efekt dotyczący regulacji ekspresji genów kodujących białka, w tym tych odpowiedzialnych za wirulencję (tab. 1). Wyniki jakie uzyskano w tym badaniu sugerują, że patogenność jest związana bezpośrednio z interakcją regulatorów, a jej charakter jest ściśle kontrolowany poprzez ekspresję poszczególnych genów.

### ***Borellia* spp.**

Borelioza z Lyme jest najbardziej rozpowszechnioną kleszczową chorobą odzwierzęcą, występującą na terenie Europy, Ameryki Północnej i Dalekiego Wschodu [Masuzawa 2004]. Za ogromną większość przypadków zachorowania odpowiadają *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii* i *Borrelia garinii* mogące powodować różne objawy choroby w tym neurologiczne, dermatologiczne, a także kardiologiczne i reumatologiczne [Gesslbauer i in. 2012].

Powierzchnia błony komórkowej bakterii z rodzaju *Borrelia* jest bardzo ważna w interakcji gospodarz – patogen, gdyż pozwala na przetrwanie w gospodarzu pośrednim jakim jest kleszcz i utrzymanie się w organizmie ssaka – gospodarzu ostatecznym. Istotnym celem badania proteomu trzech gatunków z rodzaju *Borrelia* było zrozumienie w jaki sposób skład białek błony wpływa na patogenezę, czyli mechanizm powstawania choroby. Izolacja białek błonowych została przeprowadzona poprzez zastosowanie trzech różnych metod takich jak: frakcjonowanie białek powierzchniowych w detergencie, proteolityczne trawienie zewnętrznych białek powierzchniowych, biotynylacja białek błonowych i przygotowanie znakowanych biotyną próbek z użyciem streptawidyny. Ze względu na różne właściwości białek użycie trzech metod gwarantowało pełniejszą ilościową identyfikację. Wszystkie wyizolowane białka zostały poddane analizie metodą elektroforezy dwukierunkowej i LC-MS/MS.

Rezultatem analizy proteomu była identyfikacja 537 białek, z czego 285 było charakterystycznych tylko dla rodzaju *Borrelia*. Z 285 białek 97 (34%) zostało wykrytych we wszystkich trzech gatunkach. Zidentyfikowano kilka białek biorących udział w tkankowej kolonizacji *Borrelia* w organizmie gospodarza (Pfs-2, DbpA, DbpB) i uczestniczących w patogenezie (OspA, Osp C, P66) oraz białka zewnętrznej błony, zawierające antygen (P35) czy o nieznannej funkcji (QOSPC9). Identyfikacja tych białek, wchodzących w skład błony komórkowej, może umożliwić wyznaczenie potencjalnych „kandydatów” na szczepionki przeciwko boreliozie [Gesslbauer i in. 2012].

### ***Vibrio cholerae***

Kolejny patogenny drobnoustrój *Vibrio cholerae* jest Gram-ujemną bakterią, którą można znaleźć w przybrzeżnych wodach, związana jest również z wodną fauną i florą [Haque i in. 2012]. Jest przyczyną zachorowań ludzi na cholere, chorobę stanowiącą bezpośred-



nie zagrożenie dla życia. Metodami proteomicznymi badano zmiany ekspresji białek w komórkach *V. cholerae* rosnących w warunkach tlenowych i beztlenowych. Te ostatnie odzwierciedlają warunki panujące w organizmie ludzkim.

W warunkach tlenowych nastąpił wzrost ekspresji białek zaangażowanych w transport substratów, metabolizm aminokwasów i produkcję energii, co wskazuje na aktywny wzrost bakterii. W beztlenowych warunkach ilość białek biorących udział w glikolizie i innych procesach związanych z beztlenowym oddychaniem zwiększyła się. Zaobserwowano zwiększenie ilości kilku białek pośrednio bądź też bezpośrednio związanych z ruchliwością. Badanie to być może jest punktem startowym do detekcji antygenów w celu lepszego zrozumienia patogenności i odkrycia skutecznej szczepionki [Kan i in. 2004].

### ***Mycobacterium avium***

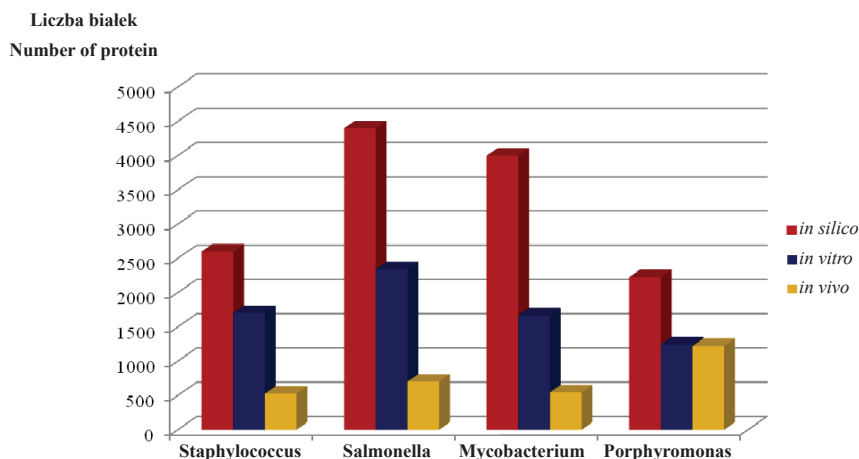
*Mycobacterium avium* to prątki z rodzaju *Mycobacterium*. Należą do drobnoustrojów względnie niezagrażających zdrowym organizmom ludzkim. Mogą jednak powodować rozpowszechnianie się infekcji wśród ludzi chorujących na AIDS. Wywołują ogólny stan zapalny skóry, węzłów chłonnych, płuc oraz jądłowstręt (<http://hivinsite.ucsf.edu/InSite/?page=kb-05-01-05#S1X>). W organizmie gospodarza *M. avium* ulega fagocytozie przez makrofagi i mnoży się wewnątrz fagosomów. Zmiana ekspresji genów *M. avium* pod wpływem fagocytozy przez ludzkie makrofagi była analizowana z wykorzystaniem technik proteomicznych. Patogeny hodowano w podłożach (RPMI 1640 i Middlebrook 7H9) oraz wewnątrz komórek makrofagowych THP-1 [Brunori i in. 2004]. Profile białkowe patogenów hodowanych w medium RPMI 1640 i po fagocytozie przez komórki THP-1 różniły się. Istotne różnice dotyczyły ilości 4 białek zidentyfikowanych jako:  $\beta$ -ketoacylo-ACP-syntetaza (KasA), czynnik elongacji Tu (EF-Tu), podjednostka  $\beta$  flawoproteiny odpowiadająca za transport elektronów (FixA) i dehydrogenaza acylo-CoA (FadE2). Trzy ostatnie białka występowały w większym stężeniu w próbach pochodzących z hodowli wewnątrz komórek THP-1 w porównaniu z próbami z hodowli w podłożach. Natomiast zawartość  $\beta$ -ketoacylo-ACP-syntetazy była niższa. Taki efekt mógł zostać wywołany specyficznym działaniem makrofagów lub wywodzić się z fizjologicznego stanu patogenu w stosunku do warunków wzrostu.

FadE2 i FixA są zaangażowane w proces  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych, będących podstawowym źródłem węgla i energii dla *M. avium*. Białko KasA bierze udział w syntezie kwasów mykoloowych, które stanowią główny składnik ściany komórkowej tego patogenu. Badania przeprowadzone na *M. avium* w istotny sposób przyczyniły się do bliższego poznania mechanizmu, dzięki któremu mykobakterie są w stanie przetrwać w obcym środowisku jakim jest ludzki makrofag. Eksperyment ten dostarczył fundamentalnej wiedzy dotyczącej wirulencji tego drobnoustroju oraz jego patogenności.

### **Proteomika w badaniu interakcji gospodarz – patogen**

Metodami proteomicznymi można także badać interakcje gospodarz – patogen. Interakcje te są bardzo złożone, więc zastosowanie nowoczesnych metod analizy proteomicznej może znacznie przyczynić się do wyjaśnienia patofizjologii procesu infekcji. Badania proteomiczne drobnoustrojów chorobotwórczych w warunkach *in vitro* są często prowadzone, natomiast badania proteomu patogenów w warunkach *in vivo* są rzadkością. Przykładem jest analiza porównawcza dotycząca ilości białek występujących w mikroorganizmach *S. aureus*, *Salmonella enterica*, *Mycobacterium tuberculosis* i *Porphyromonas gingivalis* w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* w modelach zwierzęcych [Schmidt, Völker 2011].

Wyniki porównano też z analizą *in silico*. Liczba białek ekspresjonowanych w warunkach *in vivo* była zdecydowanie niższa niż w warunkach *in vitro* (rys. 5).



Rys. 5. Porównanie ilości białek otrzymanych za pomocą analizy komputerowej i białek zidentyfikowanych w warunkach *in vitro* i *in vivo* [Schmidt, Völker 2011]

Fig. 5. Comparison of the amounts of protein obtained by using computer analysis and proteins identified in the *in vitro* and *in vivo* conditions

Ze względu na dostępność aminokwasów i innych związków u gospodarza znacznej redukcji uległa ilość enzymów odpowiadających za procesy metaboliczne [Fernandez-Arenas i in. 2007, Schmidt i in. 2010]. Wykryto również enzymy niewystępujące w warunkach *in vitro*, lecz niezbędne w warunkach *in vivo*, mogące stanowić nowe cele w terapii antybiotykowej. Co więcej, badania proteomu ujawniły u *M. tuberculosis* zmianę charakteru przyswajania składników pokarmowych z węglowodanów na tłuszcze jako główne źródło węgla i energii [Kruh i in. 2010]. Badania te dostarczyły przekonujących dowodów, że żadne z wyników badań *in vitro* nie odzwierciedlają proteomu uzyskanego w warunkach *in vivo*.

### Proteomika w badaniu metabolizmu drobnoustrojów

#### *Aspergillus flavus*

*Aspergillus flavus* to produkujący mikotoksyny patogeniczny grzyb strzępkowy, infekujący ważne towary rolnicze takie jak kukurydza, nasiona roślin oleistych, orzeszki ziemne, bawełna [Mellon i in. 2007]. Aflatoksyna produkowana przez ten grzyb jest jedną z najbardziej kancerogennych substancji naturalnych. Grzyby te stanowią zatem poważne zagrożenie zdrowia i życia ludzi. Badanie proteomiczne, czyli utworzenie „mapy białkowej”, miało za zadanie bliższe poznanie metabolizmu *A. flavus* oraz identyfikację enzymów odpowiedzialnych za produkcję aflatoksyny [Pechanova i in. 2013]. W analizie proteomicznej uzyskano 538 białek, które podzielono ze względu na funkcję biochemiczną, udział w procesach biologicznych i białka strukturalne (tab. 2).

Tabela 2. Klasyfikacja białek *A. flavus* pod względem: funkcji biochemicznej, metabolizmu oraz lokalizacji w komórce [wg Pechanova i in. 2013]Table 2. Classification of *A. flavus* proteins in terms of: biochemical function, metabolism and the location in the cell [according to Pechanova et al. 2013]

Funkcja biochemiczna Biochemical function	[%]	Metabolizm Metabolism of	[%]	Lokalizacja w komórce Cellular localisation	[%]
Hydrolazy Hydrolases	13,6	białek proteins	7,4	Membrana Membrane	3,4
Kinazy Kinases	2,6	węglowodanów carbohydrates	3,2	Mitochondrium Mitochondrium	3,1
Transferazy Transferases	11,6	aminokwasów amino acids	7,5	Jądro Nucleus	4,4
Inne enzymy Other enzymes	30,4	tłuszczów lipids	0,6	Cytoszkielekiet Cytoskeleton	2,1
Receptory Receptors	0,3	kwasów nukleinowych nucleic acids	7,5	Retikulum endoplazma tyczne Endoplasmic reticulum	0,8
Przekaźniki elektronów Electron carriers	1,0	Transport Transport	7,3	Inne organella other organelles	5,2
Białka wiążące DNA, nukleotydy Proteins binding DNA, nucleotides	35,1	Regulacja procesów biologicznych Regulation of bioprocesses	1,4	Rybosomy Ribosomes	3,7
Aktywność przeciwutleniająca Antioxydant activity	0,7	Odpowiedź na stres Response to stress	0,7	Cytoplazma Cytoplasm	13,0
Regulacja enzymów Enzyme regulation	0,2	Białka sygnałowe Signal proteins	0,2	Białka zewnątrzkomórkowe Extracellular proteins	0,3
Białka szkieletowe Structural proteins	1,8	Utylizacja S, P i N <sub>2</sub> Utilization of S, P and N <sub>2</sub>	2,2	Białka wewnątrzkomórkowe Intacellular proteins	18,2

Podczas analizy proteomu *A. flavus* udało się również zidentyfikować dwa kluczowe enzymy uczestniczące w syntezie aflatoksyny: O-metylotransferazę A i AflK/vbs/VERB syntetazę.

### ***Bacillus subtilis***

Zsekwencjonowanie genomu *Bacillus subtilis* umożliwiło wyodrębnienie 4100 genów, z których 1700 pozostaje bez poznanej funkcji [Kunst i in. 1997]. Nie zawsze znane są też kodowane przez nie białka. W badaniu proteomu *B. subtilis* spośród zidentyfikowanych 693 białek więcej niż 40% jest już znanych i biorą one udział w większości podstawowych ścieżek metabolicznych. Z pozostałych białek 88 nie ma zdefiniowanych funkcji. Ich analiza może prowadzić do poznania nowych, istotnych z punktu widzenia fizjologii procesów [Hecker, Völker 2004]. Porównawcza analiza zawartości proteomu komórek rosnących i nierosnących ujawnia co najmniej 400 białek, których synteza jest wyłączona podczas wejścia komórki w fazę stacjonarną. Z drugiej strony, produkcja więcej niż 150 białek została zaindukowana. Jednym z przykładów jest AcoB, podjednostka dehydrogenazy acetoiny. Gen *acoB* ulega ekspresji przy wyczerpaniu glukozy w podłożu. Przejście z fazy wzrostu do etapu, w którym komórka pozbawiona jest źródła węgla (glukozy), wiąże się z pełną reorganizacją ekspresji genów. Białka produkowane w odpowiedzi na stres lub brak pożywki mają zasadnicze znaczenie w badaniu fizjologii komórki, a gro-

madzenie danych na temat białek produkowanych w wyniku oddziaływań czynników środowiskowych dostarcza praktycznych informacji. Przykładami typowych białkowych wskaźników są białka KatA (peroksydaza) lub AhpC (podjednostka C reduktazy wodoronadtlenku alkilu) produkowane przy stresie tlenowym bądź też GroEL/ClpB/ClpE (białka opiekuńcze) ekspresjonowane podczas szoku cieplnego i białkowego.

## PROTEOMIKA ILOŚCIOWA W BADANIU MIKROORGANIZMÓW UTYLIZUJĄCYCH SUROWCE LIGNINOCELULOZOWE

Degradacja biomasy ligninocelulozowej jest procesem bardzo złożonym ze względu na konieczność zaangażowania szerokiego wachlarza enzymów [Jørgensen i in. 2007]. Odpowiednia wspólna hodowla różnych drobnoustrojów może pomóc znacznie zwiększyć wydajność hydrolizy surowca. Wykazanie obecności poszczególnych białek enzymatycznych może być analizowane poprzez badanie proteomiczne. Do identyfikacji i badania białek zastosowano chromatografię cieczową z tandemową spektrometrią masową, którym poddano szczepy grzybów mających zdolności degradacji surowców ligninocelulozowych i celulozowych z rodzaju *Basidiomycota* oraz *Ascomycota* [Adav i in. 2012]. Badano białka obecne w kulturach pojedynczych i mieszanych następujących szczepów *Trichoderma reesei* Rut C30, *T. reesei* QM6a, *Phanerochaete chrysosporium* oraz *Coniochaeta nepalica*. W sumie zidentyfikowano 85 enzymów (celulazy, hemicelulazy, białka ligninolityczne, proteazy i peptydazy, chitynazy, lipazy i fosfatazy). W przypadku enzymów hemicelulolitycznych (35 białek): 1→2- $\alpha$ -D-mannozydaza, esteraza acetyloksylanu,  $\alpha$ -galaktozydaza, endo-6- $\alpha$ -mannozydaza,  $\alpha$ -N-arabinofuranozydaza, karboksyloesterazy, ksylanaza są wysoce ekspresjonowane w *T. reesei* Rut C30 i *T. reesei* QM6a, co sugeruje, że są specyficzne dla gatunku *T. reesei*. Natomiast  $\alpha$ -N-arabinofuranozydaza, endo-4- $\beta$ -ksylanaza,  $\alpha$ -L-arabinofuranozydaza B, deacetylaza polisacharydowa, ramnogalakturonidaza występują w dużych ilościach w *P. chrysosporium* i *T. reesei* Rut C30. Świadczy to o tym, że oba szczepy są zaangażowane w hydrolizę wiązań chemicznych pomiędzy ligniną i celulozą/hemicelulozą. Kolejne enzymy: 1→2- $\alpha$ -D-mannozydaza, esteraza acetyloksylanu,  $\alpha$ -galaktozydaza, endo-6- $\alpha$ -mannozydaza,  $\alpha$ -N-arabinofuranozydaza, karboksyloesterazy, arabinozydaza, arabinofuranozydaza B, ksyloglukonaza, egzo-ramnogalakturonaza B, esteraza węglowodanowa, endoksylianaza,  $\alpha$ -2-mannozydaza, ksylanaza, endo-4- $\beta$ -ksylanaza wytwarzane są głównie przez *P. chrysosporium*, co dowodzi, że są dla tego grzyba specyficzne. Szczep *Coniochaeta nepalica* produkuje enzymy hemicelulolityczne w nikłych ilościach. Autorzy na podstawie wyników badań stwierdzili, że hodowla kultur mieszanych nie przyczynia się do zwiększenia produkcji białek hydrolizujących hemicelulozy.

Zdolność do dokładnego oszacowania zmian ilości i składu białek degradujących biomasę ligninocelulozową ma zasadnicze znaczenie w zrozumieniu mechanizmu enzymatycznej hydrolizy. Określenie, czy hodowla kompatybilnego konsorcjum mikroorganizmów, czy indywidualna degradacja biomasy przez drobnoustroje powoduje zwiększenie wydajności tego procesu ma ogromne znaczenie w przemyśle biorafineryjnym, włókienniczym, spożywczym oraz celulozowo-papierniczym [Lange 2007]. Proteomika pozwala nam zrozumieć funkcję każdego szczepu w społeczności drobnoustrojów, a także umożliwić monitorowanie intensywności produkcji interesującego nas białka w danych warunkach.

## PODSUMOWANIE

W pracy ukazano możliwości wykorzystania proteomiki w badaniu drobnoustrojów oraz przytoczono praktyczne aspekty wykorzystania wiedzy na temat proteomu wybranych mikroorganizmów.

Poznając skład białkowy mikroorganizmów w danych warunkach i w danym czasie, jesteśmy w stanie zdobyć wiele informacji. Najistotniejsze to: określenie, w jaki sposób zmienia się profil białkowy danego patogenu pod wpływem różnych bodźców stresowych (stres oksydacyjny, szok termiczny, brak podstawowego źródła węgla, nieodpowiednie pH, obecność antybiotyku i innych szkodliwych związków chemicznych). Dzięki temu możliwe jest znalezienie białek odpowiedzialnych za wirulencję, patogeniczność oraz odporność na antybiotyki.

Kolejnym celem badań z zakresu proteomiki jest odkrycie biomarkera, który zdecydowanie ułatwiłby nie tylko identyfikację drobnoustroju, ale także zmian chorobotwórczych, określenie fazy wzrostu komórki i procesów w niej zachodzących. Nie istniałaby wtedy konieczność analizowania całego profilu białkowego, lecz wystarczyłoby tylko wykazanie obecności i ilości poszczególnego białka lub kilku białek.

Stworzone zasoby proteomicznych baz danych będzie można wykorzystać do identyfikacji białek, stadium cyklu komórkowego, komórek oraz drobnoustrojów.

## PIŚMIENNICTWO

- Adav S.S., Ravindran A., Sok Hwee Cheow E., Kwan Sze S., 2012. Quantative proteomic analysis of secretome of microbial consortium during saw dust utilization. *Journal of Proteomics*, 75, 5590–5603.
- Bodzoń-Kułałowska A., 2010. Proteomika funkcjonalna [w:] *Proteomika i metabolomika*. (wyd.) Kraj A., Drabik A., Silberring J. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, 281–303.
- Bokarewa M.I., Jin T., Tarkowski A., 2006. *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(4): 504–509.
- Bright J.J., Claydon M.A., Soufian M., Gordon D.B., 2002. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *Journal of Microbiological Methods*: 48, 127–138.
- Brunori L., Giannoni F., Bini L., Liberatory S., Frota C., Jenner P., Thoresen O.F., Orefici G., Fattorini L., 2004. Induction of proteins upon infection of human macrophages, *Proteomics*: 10, 3078–3083.
- Bujacz G., Bujacz A., 2010. Proteomika strukturalna [w:] *Proteomika i metabolomika* (wyd.) Kraj A., Drabik A., Silberring J., Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego 333–359.
- de Hoffman E., Stroobant V., 2013. *Mass Spectrometry principles and applications*, John Wiley and Sons Ltd., Chichester, 33–36.
- Dmitrzak-Węglarz M., Hauser J., 2006. Wykorzystanie badań proteomicznych w poszukiwaniu markerów biologicznych dla chorób psychicznych. *Via Medica*, 3, 118–127.
- Drabik A., Silberring J., 2010a. „Omika” i biologia systemów [w:] *Proteomika i metabolomika* (wyd.) Kraj A., Drabik A., Silberring J. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, 1–4.
- Drabik A., Silberring J., 2010b. Wprowadzenie do proteomiki i strategii identyfikacji białek. [w:] *Proteomika i metabolomika* (wyd.) Kraj A., Drabik A., Silberring J., Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, 7–12.

- Drabik A., Bodzoń-Kulakowska A., 2010. Elektroforeza dwuwymiarowa 2-DE [w:] Proteomika i metabolomika (wyd.) Kraj A., Drabik A., Silberring J. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, 61–82.
- Fernandez-Arenas E., Cabezon V., Bermejo C., Arroyo J., Nombela C., Díez-Orejas R., Gil C., 2007. Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction. *Mol. Cell. Proteomics*, 6, 460–478.
- Gesslbauer B., Poljak A., Handwerker C., Schuler W., Schwendenwein D., Weber C., Lundberg U., Meinke A., Kungl A.J., 2012. Comparative membrane proteome analysis of tree *Borrelia* species. *Proteomics*, 12, 845–858.
- Haque M.M., Alam M., Salam A., 2012. Frequency of *Vibrio cholerae* in the Water and Plankton Samples of South-Western Coastal Aquatic Habitats of Bangladesh. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*, 36, 71–78.
- Hecker M., Völker U., 2004. Towards a comprehensive understanding of *Bacillus subtilis* cell physiology by physiological proteomics. *Proteomics*, 12, 3727–3750.
- Jarman K.H., Cebula S.T., Saenz A.J., Petersen C.E., Valentine N.B., Kingsley M.T., Wahl K.L., 2000. An algorithm for automated bacterial identification using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 72, 1217–1223.
- Jørgensen H., Kristensen J.B., Felby C. 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1, 119–134.
- Kan B., Habibi H., Schmid M., Liang W., Wang R., Wang D., Jungblut P.R., 2004. Proteome comparison of *Vibrio cholerae* cultured in aerobic and anaerobic conditions. *Proteomics*, 10, 3061–3067.
- Kebarle P., Verkerk U.H., 2011. On the Mechanism of Electrospray Ionization Mass Spectrometry [in:] *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities and Biological Applications* (eds.) Cole R.B., John Wiley and Sons Ltd., New Jersey.
- Klevens R.M., Morrison M.A., Nadle J., Petit S., Gershman K., Ray S., Harrison L.H., Lynfield R., Dumyati G., Townes J.M., Craig A.S., Zell E.R., Fosheim G.E., McDougal L.K., Carey R.B., Fridkin S.K., 2007. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *The Journal of the American Medical Association*, 298, 1763–1771.
- Kraj A., Drabik A., Silberring J., 2010. Proteomika i metabolomika. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego.
- Kruh N.A., Troutt J., Izzo A., Prenni J., Dobos K.M., 2010. Portrait of a pathogen: the *Mycobacterium tuberculosis* proteome *in vivo*. *PLoS One*: 5, e13938.
- Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M.G., Besieres P., Bolotin A., Borchert S., Borriss R., Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S.C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C.V., Caldwell B., Capuano V., Carter N. M., Choi S.K., Codani J.J., Connerton I.F., Cummings N.J., Daniel R.A., Denizot F., Devine K.M., Dusterhoft A., Ehrlich S.D., Emmerson P.T., Entian K.D., Errington J., Fabret C., Ferrari E., Foulger D., Fritz C., Fujita M., Fujita Y., Fuma S., Galizzi A., Galleron N., Ghim S. Y., Glaser P., Goffeau A., Golightly E.J., Grandi G., Guiseppi G., Guy B.J., Haga K., Haiech J., Harwood C.R., Henaut A., Hilbert H., Holsappel S., Hosono S., Hullo M.F., Itaya M., Jones L., Joris B., Karamata D., Kasahara Y., Klaerr-Blanchard M., Klein C., Kobayashi Y., Koetter P., Koningstein G., Krogh S., Kumano M., Kurita K., Lapidus A., Lardinois S., Lauber J., Lazarevic V., Lee S.M., Levine A., Liu H., Masuda S., Mauel C., Medigue C., Medina N., Mellado R.P., Mizuno M., Moestl D., Nakai S., Noback M., Noone D., O'Reilly M., Ogawa K., Ogiwara A., Oudega B., Park S.H., Parro V., Pohl T.M., Portetelle D., Porwollik S., Prescott A.M., Presecan E., Pujic P., Purnelle B., Rapoport G., Rey M., Reynolds S., Rieger M., Rivolta C., Rocha E., Roche B., Rose M., Sadaie Y., Sato T., Scanlan E., Schleich S., Schroeter R., Scoffone F., Sekiguchi J., Sekowska A., Seror S.J., Serron P., Shin B.S., Soldo B., Sorokin A., Tacconi E., Takagi T., Takahashi H., Takemaru K., Takeuchi M., Tamakoshi A., Tanaka T., Terpstra P., Tognoni A., Tosato V., Uchiyama S., Vandenbol M., Vannier F., Vassarotti A., Viari A., Wambutt R., Wedler

- E., Wedler H., Weitzenegger T., Winters P., Wipat A., Yamamoto H., Yamane K., Yasumoto K., Yata K., Yoshida K., Yoshikawa H.F., Zumstein E., Yoshikawa H., 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390, 249–256.
- Laarman A.J., Ruyken M., Malone C.L., van Strijp J.A., Horswill A.R., Rooijackers S.H., 2011. *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. *The Journal of Immunology*, 11, 6445–6453.
- Lange J.P., 2007. Lignocellulose conversion: an introduction to chemistry, process and economics. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1, 39–48.
- Lynn E.C., Chung M.C., Tsai W.C., Han C.C., 1999. Identification of Enterobacteriaceae bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 13, 2022–2027.
- Masuzawa T. 2004. Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi sensu lato* in East Asia. *Japanese journal of infectious diseases*: 57, 229–235..
- Mellon J.E., Cotty P.J., Dowd M.K.A., 2007. *Aspergillus flavus* hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 497–504.
- Monteiro R., Vitorino R., Domingues P., Radhouani H., Carvalho C., Poeta P., Torres C., Igrejas G., 2012. Proteome of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain of sequence type ST398. *Journal of Proteomics*, 75, 2892–2915.
- Neidhardt F.C., 2011. How microbial proteomics got started. *Proteomics*, 11, 2943–2946.
- Noga M., 2010. Proteomika ilościowa [in:] *Proteomika i metabolomika* (wyd.) Kraj A., Drabik A., Silberring J. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, 361–374.
- O'Farrell P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 4007–4021.
- Pechanov O., Pechan T., Rodriguez J.M., Williams P., Brown A.E. 2013. A two-dimensional proteome map of the aflatoxigenic fungus *Aspergillus flavus*. *Proteomics*, 13, 1513–1518.
- Schmidt F., Scharf S.S., Hildebrandt P., Burian M., Bernhardt J., Dhople V., 2010. Time-resolved quantitative proteome profiling of host-pathogen interactions: The response of *Staphylococcus aureus* RN1HG to internalisation by human airway epithelial cells. *Proteomics*, 10, 2801–2811.
- Schmidt F., Völker U., 2011. Proteome analysis of host-pathogen interactions: investigation of pathogen responses to the host cell environment. *Proteomics*, 11, 3203–3211.
- Suchwałko A., Podbielska H., 2010. Dwuwymiarowa elektroforeza żelowa: od eksperymentu po profile ekspresji. Część pierwsza – eksperyment. *Acta Bio-Optica et Informatica Medica*, 16, 285–292.
- Suder P., 2010. Electrospray i nanoelectrospray (ESI i nanoESI) [w:] *Proteomika i metabolomika* (wyd.) Kraj A., Drabik A., Silberring J. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, 61–82.
- Tomaszewska K., Nalewaj J., Markowska J., 2005. Proteomika – nowa metoda oznaczania markerów nowotworowych. *Rak jajnika. Onkologia Polska*, 8, 2, 79–81.
- Welker M., 2011. Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics*, 11, 3143–3153.
- Wery J.P., 2007. Application of Proteomics Technologies to Biomarker Discovery and Development – Challenges and Solutions. *Bioanalytical Systems*, 22.
- Weston A.D., Hood L., 2004. Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine. *Journal of Proteome Research*: 2, 179–196.
- Yergey A.L., Coorsen J.R., Backlund P.S., Jr., Blank P.S., Humphrey G.A., Zimmerberg J., Campbell J.M., Vestal M.L., 2002. De Novo Sequencing of Peptides Using MALDI/TOF-TOF. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13, 784–791.
- Ziebandt A., Becher D., Ohlsen K., Hacker J., Hecker M., Engelmann S., 2004. The influence of  $\mu$ g and  $\sigma$ B in growth phase dependent regulation of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Proteomics*, 10, 3034–3047.

## PROTEOMICS IN THE STUDY OF MICROORGANISMS

**Abstract.** The article presents a relatively new area of studies – proteomics – which investigates the composition, structure and function of proteins and the interactions among proteins occurring in cells. Then the most important analytical techniques of proteomics are described: two-dimensional electrophoresis, matrix-assisted laser-desorption ionization time of flight (MALDI-TOF) and electrospray ionization (ESI) mass spectrometry techniques. In order to introduce issues related to proteomics, the examples of proteome microorganisms including specific pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium avium*, *Borrelia* spp., *Aspergillus flavus*) are presented. Based on the results of the proteome, in this review the following applications of proteomic have been documented: species identification, the metabolism studies of microorganism and host-pathogen interactions and even the possibility of differentiating the enzymatic potential of the microorganisms utilizing lignocellulosic biomass. The potential of proteomic analysis was discussed in the summary of the article.

**Key words:** microorganisms proteom, MALDI-TOF-MS, pathogens identification

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.12.2013

Do cytowania – For citation: Szczepańska E., Robak M., 2013. Proteomika w badaniu drobnoustrojów. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 12 (4), 25–40.