

PRACE POGLĄDOWE

Waldemar Lutz
Barbara Kur

TOKSYKOGENOMIKA. NOWE PERSPEKTYWY TOKSYKOLOGII MOLEKULARNEJ*

TOXICOGENOMICS. NEW PERSPECTIVES FOR THE MOLECULAR TOXICOLOGY

Z Zakładu Immunotoksykologii

Instytutu Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi

STRESZCZENIE Ekspresja genów w genomie komórkowym podlega zmianom pod wpływem czynników wewnętrznych i zewnętrznych. Dzięki różnej ekspresji zestawów genów (polimorfizm) komórki wykazują zróżnicowanie morfologiczne i czynnościowe. Toksyczne czynniki środowiskowe i zawodowe mogą wpływać na komórki na poziomie transkrypcji i translacji. Poznaniem mechanizmów tego działania zajmuje się toksykogenomika funkcjonalna. Wykorzystując nowoczesne techniki biologii molekularnej i bioinformatyki przeprowadzić można analizy transkryptu (toksykogenomika) i analizy profilu białek (toksykoproteomika).

W pracy przedstawiono nowe możliwości poznania sekwencji genów i ich ekspresji z zastosowaniem techniki kostek DNA (szybka analiza polimorfizmu genetycznego) oraz techniki mikromacierzy (jednoczesna analiza setek lub tysięcy genów). Wskazano również praktyczne zastosowanie toksykogenomiki w ocenie następstw chorobowych ekspozycji na środowiskowe i zawodowe czynniki toksyczne, działające kancerogennie, hepatotoksycznie jak również neurotoksycznie poprzez opracowanie nowych grup biomarkerów wrażliwości osobniczej, biomarkerów skutków toksycznych, ustalenie zależności pomiędzy czynnikiem toksycznym i jego dawką a skutkiem mierzonym na poziomie genomu komórkowego oraz wynikami badań histopatologicznych i biochemicznych. Med. Pr. 2004; 55 (2): 193–202

SŁOWA KLUCZOWE: : toksykogenomika, toksykoproteomika

ABSTRACT Gene expression in the cellular genome is subject to changes caused by internal and external factors. Due to different expression of gene sets (polymorphism), cells show different morphological and functional characteristics. Environmental and occupational toxic agents may influence cells at the level of transcription and translation. The functional toxicogenomics attempts to explain those influences. Due to recent developments in molecular biology and bioinformatics, it has become possible to analyze protein transcript (toxicogenomics) and profile (toxicoproteomics). This work reports new opportunities to study gene sequencing and expression by means of the DNA chip technique (rapid analysis of the genetic polymorphism) and the microarrays technique (simultaneous analysis of hundreds or thousands of genes). The authors report examples of some practical applications of toxicogenomics in the assessment of the effects of pathological exposures to environmental and occupational toxic (carcinogenic, hepatotoxic and/or neurotoxic) agents, due to the development of new groups of biomarkers, such as biomarkers of individual susceptibility, biomarkers of toxic effects combined with the assay of the relationship between a toxic agent and its dose, and the effect measured at the level of the cellular genome and results of histopathological and biochemical tests. Med Pr 2004; 55 (2): 193–202

KEY WORDS: toxicogenomics, toxicoproteomics

Adres autorów: Św. Teresy 8, 90-950 Łódź, e-mail: lutz@imp.lodz.pl

Nadesłano: 28.11.2003

Zatwierdzono: 3.03.2004

© 2004, Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi

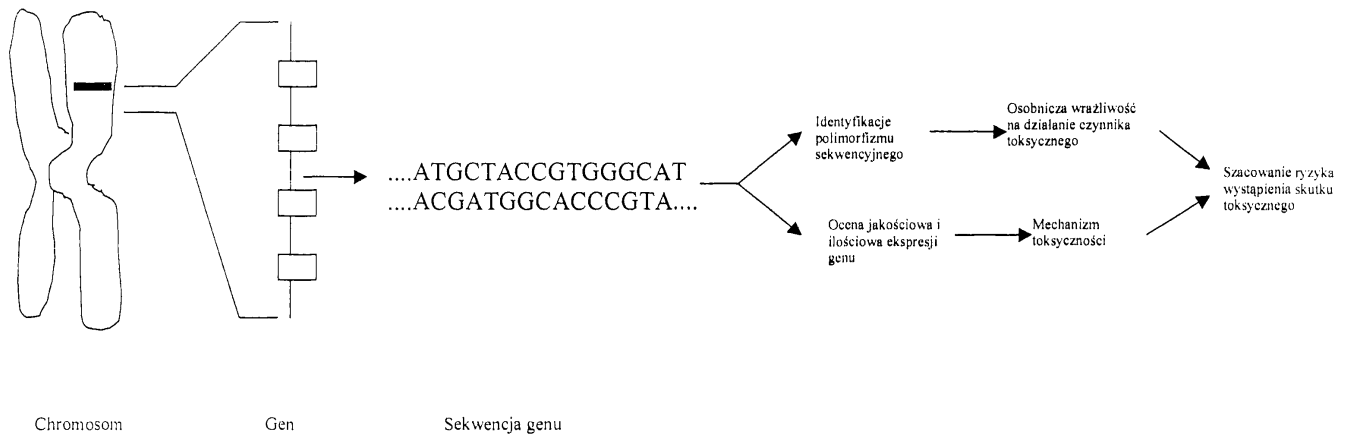
WSTĘP

Stan czynnościowy (ekspresja) genów tworzących genom komórkowy podlega zmianom pod wpływem różnych sygnałów pochodzenia wewnętrznego, jak i zewnętrznego. Sygnały te mogą zmieniać zarówno syntezę mRNA (działać na poziomie transkrypcji) jak i syntezę białka (działać na poziomie translacji). Poszczególne geny lub całe zespoły genów są wybiórczo uruchamiane w różnego rodzaju komórkach. Uważa się, że tylko niewielka część z olbrzymiej liczby genów ludzkich jest aktualnie wykorzystywana przez rozmaite typy komórek, jak np. komórki mięśniowe, nerwowe, czy komórki krwi. Każdy z tych wyspecjalizowanych typów komórek uruchamia ekspresję odmiennych genów. Komórki dokonują wyboru genów, które mają ulegać ekspresji, bez

zmiany sekwencji nukleotydowej samego DNA. DNA w wyspecjalizowanych typach komórek nadal ma pełen zestaw instrukcji niezbędnych do utworzenia całego organizmu. Komórki organizmu różnią się więc między sobą nie dlatego, że zawierają inne geny, ale dlatego, że w różnych komórkach ekspresji ulegają różne zestawy genów. To właśnie ekspresja odmiennego zestawu genów w każdym typie komórek powoduje powstanie różnic w ich wielkości, pokroju, zachowaniu i funkcji (1,2,3).

Skomplikowane współdziałanie pomiędzy genami a środowiskiem jest jednym z głównych zagadnień badawczych toksykologów, którzy starają się zrozumieć mechanizmy oddziaływania chemicznych i fizycznych czynników środowiskowych na organizm człowieka. Zdobyta w ostatnich latach wiedza na temat przechowywania i przekazywania informacji zawartej w genomie komórkowym, wprowadzenie nowych technologii do analizy tych danych, a także wyjaśnienie

* Praca wykonana w ramach zadania finansowanego z dotacji na działalność statutową nr IMP 14.4 pt. „Profil ekspresji cytokin i cząstek adhezyjnych w kretynocytach poddanych działaniu soli metali o działaniu drażniącym lub alergizującym na skórę”. Kierownik zadania: prof. dr hab. W. Lutz.

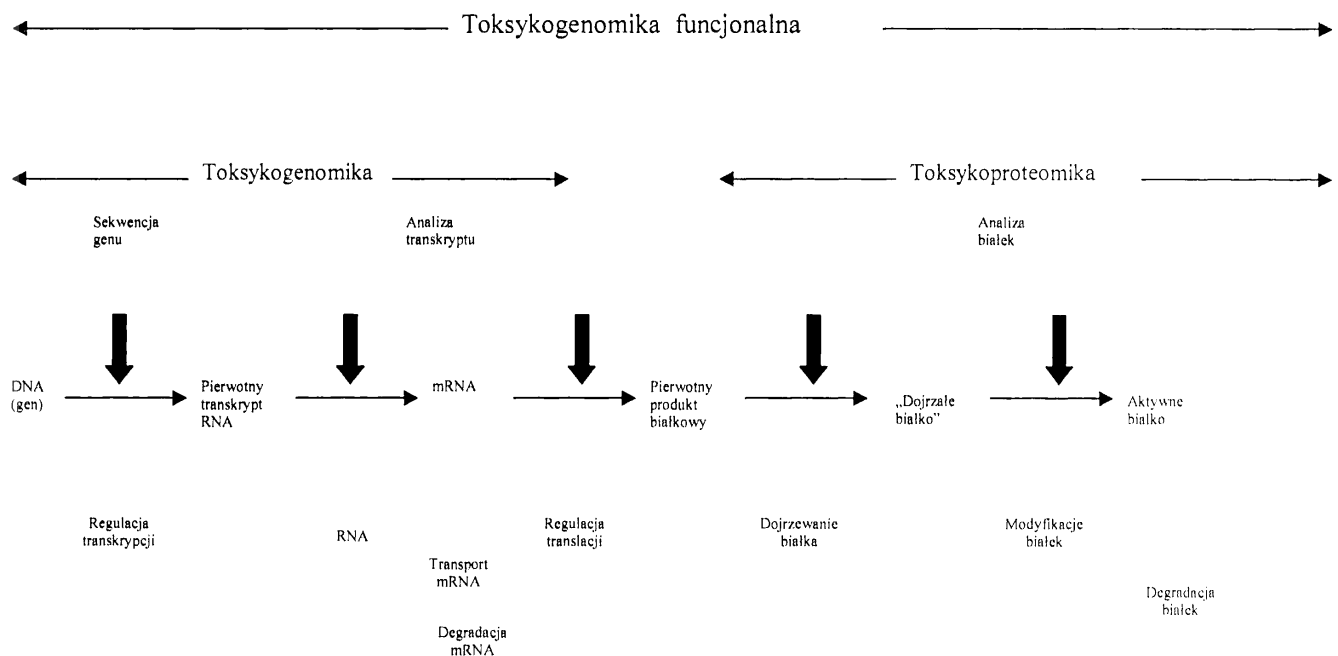


Ryc. 1. Zastosowanie toksykogenomiki w szacowaniu ryzyka wystąpienia skutku toksycznego wywołanego ekspozycją na czynnik toksyczny.

mechanizmów oddziaływania szkodliwych czynników środowiskowych na genom komórkowy, doprowadziły do powstania nowej dyscypliny naukowej nazywanej **toksykogenomiką** (4–8). Zajęła się ona badaniem zależności, jakie zachodzą między ekspozycją na czynniki toksyczne a zmianami występującymi na poziomie sekwencji nukleotydowej i ekspresji genów tworzących genom komórkowy oraz wykorzystaniem tych badań do szacowania ryzyka wystąpienia szkodliwych skutków toksycznych (ryc. 1). Umożliwia ona równoczesny monitoring ekspresji setek, a nawet tysięcy genów w oparciu o pomiar ilości mRNA, syntetyzowanych w procesie transkrypcji na poszczególnych genach (9). Wykorzystując dane, dotyczące poznania sekwencji nukleotydowej DNA, tworzącego poszczególne geny, podjęto badania mające określić,

w jakim zakresie zmiany w tej sekwencji mogą wpływać na odpowiedź komórki na działanie czynników toksycznych.

Każdy człowiek posiada w swoim genomie zestawy genów, które wykazują pewne zróżnicowanie (polimorfizm) w sekwencji nukleotydowej w stosunku do generalnej populacji. Niektóre z tych polimorfizmów nie mają lub mają tylko niewielki wpływ na ekspresję genów i związaną z tym syntezę określonych białek komórkowych. W niektórych jednak przypadkach, zwłaszcza w tych, w których polimorfizm dotyczy genów uczestniczących w odpowiedzi komórki na działanie czynnika toksycznego, np. enzymów metabolizujących toksyczny związek chemiczny, może on w istotny sposób wpływać na osobniczą wrażliwość na działanie czynnika toksycznego (10,11).



Ryc. 2. Uproszczony schemat przedstawiający wpływ czynnika toksycznego na poszczególne etapy procesu ekspresji genu (od genu do aktywnego białka). Zaznaczono obszary związane z badaniem tego wpływu przez toksykogenomikę, toksykoproteomikę oraz toksykogenomikę funkcjonalną.

Opisywanie procesu patologicznego, towarzyszącego oddziaływaniom czynników toksycznych na komórki tylko na poziomie syntezy mRNA jest niekompletne. Badania produktu ekspresji genu, jakim jest mRNA, mogą dostarczyć jedynie danych wskazujących, które z genów ulegają aktywacji, ale nie mówią, jaki jest ich udział w procesie syntezy białka. Ponadto, na mierzone zmiany w zawartości mRNA istotny wpływ wywiera szybkość degradacji transkryptu, splicing alternatywny oraz posttranskrypcyjna regulacja ekspresji genu. Obecnie mamy coraz więcej dowodów na to, że ocena profilu białek syntetyzowanych pod kontrolą genów wydaje się lepszym wskaźnikiem oddziaływań ksenobiotyków czy procesów chorobowych na ekspresję genów (12). Również interpretacja zmian w profilu białek komórkowych, jako dodatkowego wskaźnika ekspresji genów, stwarza nadal dość istotne problemy. Białko syntetyzowane na matrycy mRNA w procesie translacji może ulegać różnym zmianom, tzw. zmianom posttranslacyjnym. Np. zmiany w składzie aminokwasowym, czy modyfikacje takie, jak glikozylacja i fosforylacja, radykalnie zmieniają funkcję komórkową białek. Ponadto, łańcuchy polipeptydowe białek syntetyzowanych na matrycy mRNA mogą tworzyć kompleksy multibiałkowe o całkowicie odmiennej funkcji niż pojedyncze białko. Wszystkie te procesy mogą być zmieniane przez oddziaływanie czynnika toksycznego i tym zagadnieniem zajęła się **toksykoproteomika** (13).

Poznanie całościowe problematyki oddziaływań czynników toksycznych na funkcjonowanie genomu komórkowego, które geny i w jakim rozmiarze ulegają ekspresji, jak na zmiany tej ekspresji wpływają zmiany w sekwencji nukleotydowej genów oraz jak zmienia się struktura i funkcja białek kodowanych przez te geny w warunkach działania czynnika toksycznego, stało się przedmiotem badań **toksykogenomiki funkcjonalnej** (ryc. 2) (14). Ta nowa dyscyplina naukowa wykorzystuje najnowsze techniki biologii molekularnej i bioinformatyki do identyfikacji oraz charakterystyki mechanizmów działania związków chemicznych o uznanym potencjale toksycznym, a także tych związków, które mogą posiadać taki potencjał. Toksykogenomika funkcjonalna, dając możliwość równoczesnego badania tysięcy transkryptów genowych oraz syntetyzowanych pod ich kontrolą białek, stworzyła ogromne możliwości nie tylko dla poznania mechanizmów toksycznego działania związków chemicznych na komórki organizmu ludzkiego, ale dała również możliwość opracowania nowych grup biomarkerów wrażliwości osobniczej oraz biomarkerów skutków toksycznych. Powinno to w znaczącym stopniu przyczynić się do poprawy monitoringu biologicznego osób narażonych na zawodowe i środowiskowe czynniki toksyczne (15).

NOWE METODY POZNAWANIA SEKWENCJI GENÓW I ICH EKSPRESJI

Wykrycie, że informacja genetyczna jest zakodowana w sekwencji nukleotydów DNA spowodowało podjęcie na dużą

skalę badań nad opracowaniem metod umożliwiających bezpośredni wgląd w tę sekwencję oraz poznanie, w jaki sposób geny działają na poziomie molekularnym. Rekombinacyjna technologia DNA umożliwiła wybranie dowolnego genu spośród tysięcy genów zawartych w komórce i dokładne określenie jego struktury. Uzyskano możliwość rozcinania długich cząsteczek DNA na specyficzne zestawy fragmentów za pomocą nukleaz restrykcyjnych, z których każda rozcina dwuniciową helisę DNA tylko w miejscu występowania określonych, krótkich sekwencji nukleotydowych. Otrzymane fragmenty DNA można rozdzielić na podstawie ich wielkości za pomocą elektroforezy żelowej i za pomocą odpowiednich technik dokonać analizy ich sekwencji nukleotydowych. Wprowadzenie technik hybrydacyjnych dało możliwość wykrycia w mieszaninie kwasów nukleinowych dowolnych sekwencji fragmentów DNA lub RNA. Techniki te wykorzystywały zdolność pojedynczych nici DNA lub RNA do tworzenia dwuniciowych helis tylko z łańcuchami o komplementarnej sekwencji nukleotydów. W reakcjach hybrydacji jako sondy stosuje się jednoniciowe DNA o znanych sekwencjach, znakowane barwnikami fluorescencyjnymi lub radioizotopami. Metody klonowania stworzyły warunki dla wyselekcjonowania jednej cząsteczki DNA o określonej sekwencji nukleotydowej, spośród milionów rozmaitych cząsteczek DNA i powielenia jej w czystej postaci w dowolnej ilości. Utworzone zostały biblioteki cDNA (komplementarny DNA uzyskany z mRNA w obecności enzymu odwrotnej transkryptazy z mRNA), zawierające klonowane kopie DNA wszystkich mRNA określonego typu komórek lub tkanek. Inaczej niż w przypadku klonów genomowych, klonowane cDNA zawierają tylko sekwencje kodujące białka (eksony). Nie ma w nich sekwencji niekodujących (intronów, miejsc regulatorowych oraz promotorów). Bardzo ważnym narzędziem badawczym okazała się łańcuchowa reakcja polimeryzacji (PCR) prowadzona *in vitro* z użyciem polimerazy DNA. Dzięki PCR można wybiórczo, bardzo szybko i w dużych ilościach, replikować wybrane sekwencje zawarte w dowolnym DNA. PCR można stosować do powielania (amplifikacji) tylko takiego DNA, którego sekwencje początkowa i końcowa są znane. Polimeraza DNA naprowadzana na dany fragment DNA przez startery syntetyzuje wiele kopii (najczęściej około miliarda) potrzebnego odcinka DNA.

Ostatnie lata przyniosły dalszy postęp techniczny w postępowaniach badawczych zmierzających do wykrywania polimorfizmów genetycznych oraz zmian w ekspresji poszczególnych genów wchodzących w skład genomu komórkowego ssaków, w tym również człowieka. Szczególną uwagę zwraca wprowadzenie dwóch zbliżonych do siebie technik biologii molekularnej: techniki “kostek” DNA (ang. DNA chips), umożliwiającej dokonanie szybkiej analizy polimorfizmu danego genu oraz techniki “mikromacierzy” DNA (ang. DNA microarrays), pozwalającej na jednoczesną analizę ekspresji setek lub nawet tysięcy genów w komórkach poddanych działaniu jednego lub wielu czynników toksycznych (4,16).



TECHNIKA KOSTEK DNA

Technika kostek DNA pozwoliła na bardzo szybkie sekwencjonowanie DNA (poznanie kolejności zasad w całym genie lub tylko w jego fragmentach) przez hybryzację ze zbiorami oligonukleotydów. W sekwencjonowaniu przez hybryzację wykorzystuje się zestaw sond oligonukleotydowych o zdefiniowanej sekwencji zasad do wyszukiwania komplementarnych sekwencji w badanej cząsteczce DNA (4,17).

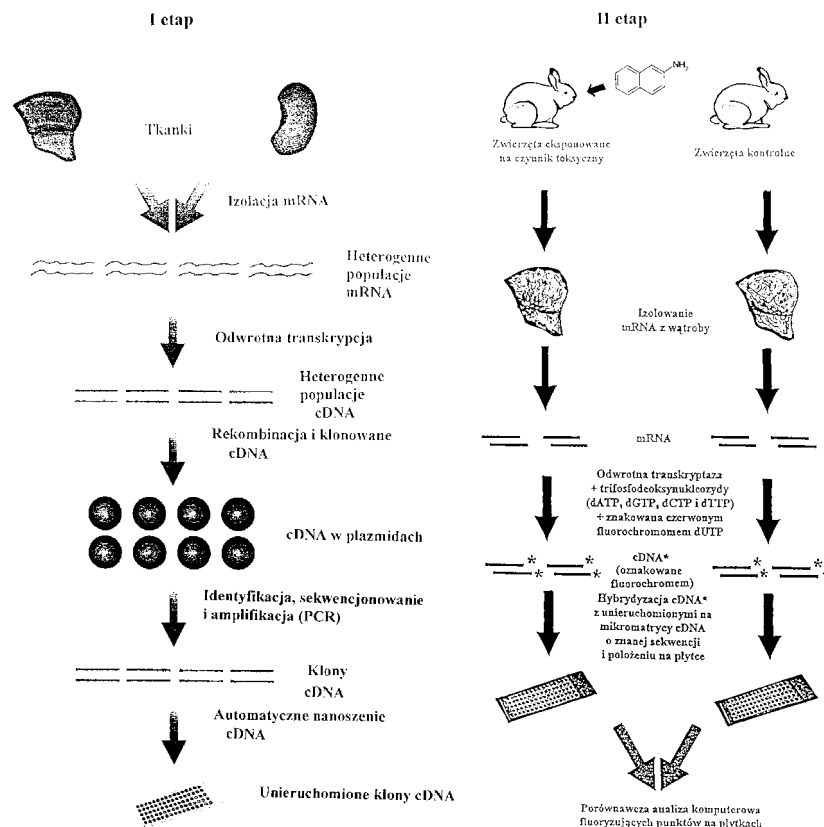
Badany DNA, w którym chcemy wykryć obecność określonej sekwencji nukleotydowej, np. tej zawierającej zmutowany odcinek genu, zostaje izolowany z komórek lub tkanki i cięty na małe fragmenty za pomocą specyficznych enzymów restrykcyjnych. Na tym etapie ważne jest uzyskanie odpowiedniego fragmentu cząsteczki DNA, zawierającego zmutowane miejsce genu. Można to uzyskać stosując odpowiedni zestaw enzymów restrykcyjnych, które przecinają cząsteczkę DNA w ściśle określonych miejscach, o odpowiedniej dla danego enzymu sekwencji nukleotydowej. Do uzyskanych fragmentów DNA dołącza się następnie znacznik fluorochromowy. Otrzymaną mieszaninę oznakowanych fragmentów DNA nanosi się na przygotowaną wcześniej płytkę (kostkę), na której zostały zsyntetyzowane oligonukleotydy o znanej sekwencji nukleotydowej. Są one dobrane tak, aby był wśród nich również oligonukleotyd, mający sekwencję komplementarną do oznakowanego fragmentu DNA, zawierającego zmutowany odcinek genu. Oznakowane fragmenty DNA

o sekwencji komplementarnej z oligonukleotydami naniesionymi na płytkę zostają na niej związane, a pozostałe usunięte przez przemycie płytki. Płytkę zostaje przeniesiona do czytnika, sprzężonego z komputerem, w którym promień laserowy przegląda płytkę z sondami oligonukleotydowymi, rządkiem po rządkiem. Promień laserowy powoduje świecenie tych miejsc na płytce, które zawierają zhybryzowany fragment DNA z dołączonym fluorochromem. Ponieważ znana jest sekwencja i umiejscowienie na płytce sond oligonukleotydowych można ustalić, jaka jest sekwencja świecących fragmentów DNA, które uległy hybrydacji z tymi sondami. Analizę taką dokonuje odpowiednio zaprogramowany komputer.

TECHNIKA MIKROMACIERZY DNA

Technika mikromacierzy DNA stworzyła możliwość oceny ekspresji każdego z genów obecnych w genomie ssaków, a także oceny ekspresji każdej z polimorficznych form tych genów (18). Postępowanie zastosowane w tej technice obejmuje dwa etapy (ryc. 3).

Etap I. Na podłoże szklane lub nylonowe są nanoszone, w wysokim zagęszczeniu, indywidualne łańcuchy cDNA (mikromacierze DNA) o długości od 600 do 2400 nukleotydów. Stanowią one kopie całych lub części cząsteczek mRNA, powstających w wyniku ekspresji określonych genów. Przygotowanie mikromacierzy z cDNA zaczyna się od izolowania



Ryc. 3. Ocena ekspresji genów w hepatocytach w obecności czynnika toksycznego (schemat postępowania).



informacyjnych RNA (mRNA) z kilku różnych tkanek (np. wątroby i nerek). Ma to na celu zwiększenie szans uzyskania mRNA z możliwie wszystkich genów ulegających ekspresji w badanym genomie (w tym również różnych form polimorficznych). Otrzymane mRNA są przetwarzane na kompletne kopie DNA (cDNA) z wykorzystaniem enzymu odwrotnej transkryptazy. Enzym ten jako matrycę dla syntezy cDNA wykorzystuje RNA. W dalszej kolejności mieszanina cDNA jest klonowana do małych bakteryjnych minichromosomów, plazmidów. Indywidualne plazmidy, z których każdy zawiera jeden cDNA, poddawane są sekwencjonowaniu celem poznania tożsamości każdego fragmentu. Następnie fragmenty plazmidowego DNA, zawierające odpowiednie cDNA, są indywidualnie namnażane przy zastosowaniu reakcji łańcuchowej polimeryzacji – PCR (ang. polymerase chain reaction), poddane procesowi oczyszczania i umiejscawiane na stałym podłożu (szklanym lub nylonowym) przez specjalne zautomatyzowane urządzenie. Lokalizacja każdego naniesionego fragmentu cDNA na płytce oraz jego sekwencja nukleotydowa są zapisywane w pamięci komputera.

Etap II. Na tym etapie dokonuje się określenia zmian w ekspresji genów wywołanej przez czynnik toksyczny w badanym narzędzie, np. wątrobie lub w komórkach pochodzących z hodowli. W tym celu mRNA jest równolegle izolowany z wątroby zwierzęcia otrzymującego pokarm kontrolny oraz z wątroby zwierzęcia, które jest karmione tym samym pokarmem, ale z dodatkiem toksycznego związku chemicznego. Uzyskane mRNA, pochodzące od obu zwierząt, są wykorzystywane jako matryce dla syntezy cDNA (komplementarnych kopii mRNA) w reakcji katalizowanej przez odwrotną transkryptazę. Reakcja przebiega w obecności trifosforanów nukleozydów znakowanych wskaźnikiem fluorescencyjnym lub radioaktywnym. Mieszanina powstałych cDNA, oznakowanych fluorochromem (lub radioizotopem), nanoszona jest na wcześniej przygotowane płytki (etap I postępowania). Oznakowane fluorochromem cDNA hybrydują z komplementarnymi fragmentami cDNA obecnymi na płytce. Miejsca na płytce zajęte przez oznakowane hybrydy są wykrywane z użyciem fosfoimagera do wykrywania znacznika radioizotopowego lub skanera laserowego do wykrywania znacznika fluorescencyjnego. Na zarejestrowanym obrazie uwidaczniają się charakterystyczne kolorowe plamy, odpowiadające swoją lokalizacją tym fragmentom genów, które uległy ekspresji w wyniku zadziałania czynnika toksycznego. Intensywność sygnału radioaktywnego lub fluorescencyjnego odpowiada ilościowo rozmiarowi ekspresji danego genu. Otrzymane wzory ekspresji genów w genomie zwierzęcia kontrolnego i eksponowanego na czynnik toksyczny są następnie porównywane i ustala się, stosując odpowiednie techniki bioinformatyczne, które z genów są regulowane pozytywnie, a które negatywnie. W ten sposób można wykrywać i oceniać działanie nie tylko pojedynczych genów biorących udział w odpowiedzi toksycznej komórki, ale oceniać skoordynowane działanie całych zespołów genów. Obecna technologia pozwala na równoczesne monitorowanie eks-

presji co najmniej 10 tys. genów. W niedalekiej przyszłości, kiedy wszystkie ludzkie geny zostaną zidentyfikowane i sklonowane, a postęp technologiczny pozwoli na dalszą miniaturyzację stałego podłoża do tworzenia mikromacierzy DNA, będzie możliwe badanie zmian ekspresji wszystkich genów wchodzących w skład genomu ludzkiego.

ZASTOSOWANIA TOKSYKOGENOMIKI

Wprowadzenie genomiki do toksykologii i medycyny pracy powinno stworzyć warunki do lepszego poznania mechanizmów toksycznego oddziaływania substancji chemicznych, środowiskowych i zawodowych na organizm człowieka. To poznanie powinno wynikać z określenia zależności, jakie zachodzą między ekspozycją na czynniki toksyczne a zmianami występującymi na poziomie genomu komórkowego, związanymi z ekspresją określonych genów i zespołów genów. Analiza spektrum zmian w ekspresji zespołów genów kontrolujących procesy naprawcze, kontrolujących procesy przekazywania sygnałów pobudzenia i wzrostu komórki, czy też procesy biotransformacji toksyn chemicznych, powinna umożliwić nie tylko określenie charakteru i rodzaju tych zmian, ale także określić, jakie mogą być następstwa chorobowe, związane z odpowiedzią komórki na ekspozycję na toksyny chemiczne. Oczywiście jest, że całkowite zrozumienie mechanizmów, przez które substancje chemiczne mogą powodować wszystkie zmiany chorobowe w organizmie człowieka jest raczej bardzo odległym celem. Tym niemniej już obecnie jest możliwa identyfikacja oraz poznanie sposobów działania różnych substancji chemicznych w przypadku niektórych schorzeń. Takim przykładem może być poznanie molekularnych podstaw powstawania raka w wyniku oddziaływania niektórych toksyn chemicznych na organizm zwierząt i człowieka oraz wykazanie, że u podstaw rozwoju tej choroby leżą zmiany w strukturze i ekspresji pewnych grup genów, protoonkogenów i genów supresorowych. Coraz więcej mamy danych potwierdzających, że również w przypadku innych chorób trapiących ludzkość istotne znaczenie mają zmiany genowe, indukowane przez toksyny chemiczne.

Technika mikromacierzy DNA okazała się już przydatna do wykrywania potencjalnej hepatotoksyczności związków chemicznych, a także do lepszego poznania mechanizmów toksycznych związków chemicznych o już poznanych właściwościach hepatotoksycznych.

Wang i wsp. (19) zastosowali technikę mikromacierzy DNA do identyfikacji docelowych genów odpowiedzialnych za indukowanie apoptozy przez etopozyd w komórkach U2-OS. Zbadano ekspresję 6591 genów, z których 62 aktywnie uczestniczyły w komórkowej odpowiedzi na działanie etopozydu. Do dalszej analizy wybrano 12 genów, których zmiana ekspresji może łączyć się z wprowadzaniem komórki w stan apoptozy. Były to m.in. geny kodujące białko p21, antygen jądrowy związany z proliferacją komórkową oraz dwa geny kodujące, regulatorowe białka p53 oraz gen kodujący dekarboksylazę ornitynową.



Waring i wsp. (20) zbadali zmiany w profilu ekspresji genów komórek wątrobowych 15 różnych heptotoksyn, w tym alkoholu alilowego, amiodaronu, Arocloru 1254, soli arsenu, karbamazepiny, czterochloru węgla, dietylonitrozaminy, dimetyloformamidu, dikwatu, etopozydu, indometacyny, metapirylenu, metotreksatu, monokrotaliny i 3-metylocholantrenu. Te związki chemiczne powodują różne toksyczne uszkodzenia wątroby takie jak: martwica, uszkodzenia DNA, marskość, hipertrofię, raka. Analizę profilu ekspresji genów przeprowadzono na podstawie oceny RNA, otrzymanego z wątroby szczurów poddanych działaniu wymienionych hepatotoksyn oraz RNA zwierząt kontrolnych. Profile ekspresji genów uzyskane dla poszczególnych hepatotoksyn były porównane z wynikami badań histopatologicznych oraz parametrami biochemicznymi, oznaczonymi w osoczu krwi (AST, ALT, ALP, cholesterol, bilirubina całkowita, glukoza, GGT, azot mocznikowy). Wykazano występowanie znamiennej korelacji między danymi uzyskanymi z profilu ekspresji genów a oceną histopatologiczną i wynikami badań biochemicznych. Wykazano np., że 3-metylocholantren, powodujący wystąpienie hipertrofi komórek wątrobowych przez rozrost siateczki gładkiej, przyczynia się do aktywacji genów kodujących CYP1A1, CYP1B1 i S-transferazę glutationową. Z kolei czterochlorek węgla, który powoduje uszkodzenie komórek wątrobowych przez stymulację procesów wolnorodnikowych, wywołuje zwiększenie ekspresji genów kodujących oksygenazę hemową, kinazę białkową p38 aktywowaną mitogenem, cytochrom b558 oraz S-transferazę glutationową. Interesująca była obserwacja, że heptotoksyny, powodujące wzrost aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP) w surowicy, powodują wzrost ekspresji 12 genów, z których aż 8 kodowało białka związane z metabolizmem cholesterolu.

Harris i wsp. (21) przeprowadzili analizę profilu ekspresji genów w komórkach wątrobowych, poddanych działaniu czterochloru węgla i etanolu. Oba związki różniły się znacznie profilem ekspresji genów, co jest zgodne z odmiennym mechanizmem ich toksycznego działania. Czterochlorek węgla powodował wzrost ekspresji genów kodujących białka, biorące udział w transporcie pozakomórkowym, białka związane z sygnalingiem komórkowym. Natomiast etanol powodował hamowanie ekspresji genów kodujących białka, związane ze stresem komórkowym oraz metabolizmem.

W innej pracy (22) podjęto badania zależności dawka-skutek na poziomie genomu komórkowego w przypadku oddziaływania na wątrobę myszy trzech różnych toksyn środowiskowych: chlorku kadmu, benzo(a)pirenu i trichloroetyleny. Mikromacierz DNA zastosowana w tych badaniach zawierała cDNA 148 genów kodujących enzymy I i II fazy biotransformacji, enzymy naprawcze DNA, białka stresowe, cytokiny oraz geny kodujące białka niezbędne do podtrzymania normalnego metabolizmu komórkowego, tzw. housekeeping gene (geny utrzymujące porządek w domu). Zgodnie z oczekiwaniami, w przypadku chlorku kadmu, największą stymulację ekspresji stwierdzono dla genów kodujących metalotioneinę I i II (ponad 5000-krotny wzrost ekspresji).

Równie wysoki wzrost ekspresji stwierdzono dla genów kodujących inne białka stresowe w tym białka szoku termicznego Hsp105 i Hsp86 oraz genów kodujących białka wczesnej odpowiedzi, m.in. białko c-jun. W przypadku genów kodujących enzymy metabolizujące ksenobiotyki niewielki, ale wyraźnie zaznaczony, wzrost ekspresji wystąpił w przypadku genów kodujących cytochromy P450 (geny Cyp2f2 i Cyp3a11). Towarzystwo temu zahamowanie ekspresji genu kodującego metylotransferazę II. W przypadku benzo(a)pirenu zdecydowanie największą ekspresję stwierdzono dla genu kodującego CYP1A1, w znacznie mniejszym stopniu zwiększyła się ekspresja genu kodującego CYP1A2. Z kolei podanie trichloroetyleny spowodowało zwiększenie ekspresji genów kodujących białka szoku termicznego Hsp25 i Hsp86 oraz CYP2A. Badania te zwróciły uwagę na fakt, że rozmiar ekspresji genów wywołany przez oceniane toksyny środowiskowe zależy nie tylko od rodzaju toksyny, ale również od dawki podanego związku chemicznego i zmienia się w czasie po zadziałaniu tych toksyn na wątrobę.

Bulera i wsp. (23) dokonali oceny profilu ekspresji genów (na mikromacierzy zawierającej 1600 genów z genomu szczura) w wątrobach szczurów, którym podawano różne hepatotoksyny, w tym mikrocytynę, fenobarbital, lipopolisacharyd, czterochlorek węgla, tioacetamid oraz octan cyproteronu. Wykazano, że wszystkie badane związki powodowały zmiany w ekspresji znacznej liczby genów kodujących białka, związane z przekazywaniem sygnału pobudzenia, metabolizmem lipidów oraz wystąpieniem reakcji zapalnej. W większości przypadków zmiany w profilu ekspresji genów występowały mimo braku takich danych ze strony parametrów biochemicznych, stosowanych w chemii klinicznej do wykrywania zmian toksycznych w wątrobie. Zaobserwowano, że profil ekspresji genów zmieniał się nie tylko w zależności od rodzaju heptotoksyny, na którą były ekspozowane zwierzęta, ale również w zależności od czasu trwania tej ekspozycji.

Ruepp i wsp. (24) podjęli próbę wyjaśnienia molekularnych aspektów toksycznego oddziaływania acetaminofenu na komórki wątrobowe z zastosowaniem techniki mikromacierzy DNA. Badania te wykazały jednak, że podanie subtoksycznej (150mg/kg ip) lub toksycznej (500 mg/kg ip) dawki acetaminofenu myszom wywołuje tylko zmiany w zawartości niektórych białek w mitochondriach komórek wątrobowych (m.in. syntazy ATP oraz enzymów związanych z β -oksydacją kwasów tłuszczowych). Te zmiany były konsekwencją bezpośredniego oddziaływania aktywnego metabolitu acetaminofenu, N-acetylo-p-benzochinonoiminy na białka mitochondrialne, a nie skutkiem zmienionej ekspresji genów. Nie udało się wykazać, aby toksyczność acetaminofenu na wątrobę można było łączyć z charakterystycznym dla tego związku profilem ekspresji genów. Bardziej przydatne w tym względzie jest badanie profilu białek (enzymów) biorących udział w przemianach energetycznych mitochondriów. Ta opinia jest nieco odmienna od tej, jaką wcześniej przedstawili Reilly i wsp. (25).



Technika mikromacierzy DNA została zastosowana dla wyjaśnienia mechanizmu indukowanej przez kadm demineralizacji kości (26). Wyniki badania profilu ekspresji genów w osteoklastach wykazały, że kadm stymuluje demineralizację kości przez aktywację szlaku kinaz białkowych, aktywowanych mitogenem (kinaza p38 MAP). Łączyło się to z aktywacją genów kodujących takie białka, jak ATPazowa pompa protonowa, integryna alfa V, receptor transferyny i src-podobne białko adaptorowe. Natomiast geny kodujące białka związane z formowaniem tkanki kostnej, odpowiedzi stresowej, czynniki wzrostu i cząsteczki sygnałowe, nie wykazywały istotnych zmian w ekspresji.

Ukazała się również praca próbująca wyjaśnić genotoksyczne i epigenetyczne mechanizmy działania kancerogennego niklu(II) na komórki płucne z wykorzystaniem techniki mikromacierzy DNA (27). Wykazano, że w mechanizmie kancerogennego oddziaływania tego metalu bierze udział wiele genów kodujących białka transkrypcyjne, białka związane z procesem biosyntezy białek i ich stabilizacją, białka cytoszkieletu komórkowego, białka związane z metabolizmem komórkowym oraz białka błon komórkowych i macierzy pozakomórkowej.

Przedstawiono również zmiany w ekspresji genów związane z neurotoksycznym działaniem metali ciężkich (28). Szczególną uwagę zwrócono na geny kodujące białka transkrypcyjne, zawierające motyw palca cynkowego.

Aktualnie zostały stworzone możliwości wykorzystania handlowo dostępnych mikromacierzy DNA, tzw. ToxBlotów (29). Opracowane mikromacierze DNA ToxBlotów umożliwiają równoczesną ocenę ekspresji kilkuset genów w warunkach oddziaływania czynników toksycznych, związanych np. z inicjacją i promocją procesu nowotworowego (Cancer ToxBlot) (30,31) lub z supresyjnym i stymulującym oddziaływaniem czynników toksycznych na komórki układu odpornościowego (ToxBlot Immunology) (29). ToxBlot Endocrinology and Neurology znalazł zastosowanie w wyjaśnieniu mechanizmów toksycznego działania związków chemicznych, skażających środowisko bytowania człowieka, które swoje działanie toksyczne ujawniają przez oddziaływanie na receptor estrogenowy (32). Z kolei ToxBlot Safety Assessment został wykorzystany do wyjaśnienia mechanizmu powstawania uwrażliwienia na insulinę przez związki tiazolidonowe (29).

BADANIE PROFILU EKSPRESJI BIAŁEK KOMÓRKOWYCH I ICH ZASTOSOWANIE W OCENIE SZKODLIWYCH ODDZIAŁYWAŃ CZYNNIKÓW TOKSYCZNYCH

Toksykoproteomika wykorzystuje technikę wysoce rozdzielczej dwuwymiarowej elektroforezy białek na żelu poliakrylamidowym oraz spektrometrię masową do identyfikacji setek rozdzielonych na żelu białek komórkowych (33). Ostatnio wprowadza się nowe techniki rozdzielcze, takie jak elektroforeza kapilarna oraz wysoko sprawna chromatografia

cieczowa (HPLC), a do identyfikacji białek stosuje się techniki oparte na reakcji antygen-przeciwciała. W oparciu o bibliotekę cDNA przygotowano gotowe mikromacierze białkowe, umożliwiające rozpoznanie ponad 25 000 białek komórkowych w oparciu o reakcję antygen-przeciwciała (34). Szczególnie obiecująca do identyfikacji białek rozdzielonych mikrokapilarną HPLC wydaje się technika kodowanego powinowactwa znacznika izotopowego (isotope-coded affinity tag) (35). Dotychczas proteomika ograniczała się do badania białek o masie cząsteczkowej >10 kDa. Ostatnio pojawiły się doniesienia o możliwości badania peptydów oraz białek o małej masie cząsteczkowej, 0,5–5 kDa (peptydomika) (36).

Istotnym walorem stosowanych obecnie przez proteomikę technik badawczych (toksykoproteomikę) jest możliwość badania modyfikacji strukturalnych i czynnościowych, pojawiających się w białkach już po translacji mRNA na kolejność aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym (zmiany posttranslacyjne). Naturalne procesy komórkowe, takie jak systemy sygnałowe, aktywacja i deaktywacja enzymów, wewnątrzkomórkowa translokacja białek oraz tworzenie nowych kompleksów z innymi białkami, są częstymi modyfikacjami posttranslacyjnymi białek (35). Jedną z częściej spotykanych modyfikacji posttranslacyjnych jest fosforylacja białek, niezbędna w procesach regulujących funkcjonowanie życiowo ważnych procesów metabolicznych oraz w sygnalizacji komórkowej (37). Niedawno wykazano, że więcej niż połowa białek komórkowych jest glikoproteinami, a umiejscowienie grupy glikonowej na białku, podobnie jak grupy fosforanowej, nie jest zapisane w informacji przekazywanej przez mRNA (38). Posttranslacyjne modyfikacje białek obejmują również te, będące konsekwencją oddziaływania toksyn chemicznych lub ich metabolitów. Należą tu np. addukty tworzone z białkami przez reaktywne pośredniki metaboliczne toksyny chemicznej. Identyfikacja takich adduktów, podobnie jak identyfikacja innych zmodyfikowanych białek, jest możliwa przy użyciu stosowanych obecnie w proteomice technik badawczych (39).

Po raz pierwszy badanie zmian profilu białek komórkowych wywołanych ekspozycją na czynnik toksyczny wykonano opierając się na wizualnej ocenie indywidualnych białek rozdzielonych za pomocą dwuwymiarowej elektroforezy żelowej (40). Przedmiotem badania były hepatocyty poddane działaniu tioacetamidu. Szybko okazało się jednak, że wizualna ocena rozdzielonych białek jest daleko niewystarczająca i wymaga zastosowania czytnika sprzężonego z odpowiednio zaprogramowanym komputerem. Taki skomputeryzowany system został zastosowany przez Lemkina i wsp. (41) do oceny zmian w profilu białek fagocytów poddanych działaniu włókien azbestu. Od tego czasu ukazało się wiele prac, w których, wykorzystując proteomikę, dokonano oceny zmian białkowych w warunkach ekspozycji na czynniki heptotoksyczne (42), oceny nefrotoksyczności wywołanej ekspozycją na metale (35), leki oraz paliwo rakietowe (12,43), a także zmian toksycznych w płucach, komórkach



układu odpornościowego, komórkach układu rozrodczego i komórkach serca oraz zmian neurotoksycznych (35). Proteomika została również wykorzystana w badaniu skutków wywołanych w poszczególnych typach komórek oraz narządach przez promieniowanie UV, promieniowanie jonizujące oraz pola elektromagnetyczne (44,45,46).

UWAGI KOŃCOWE

Aktualnie podkreśla się, że toksykogenomika funkcjonalna stała się strategiczną dyscypliną naukową, która sama i w połączeniu z wprowadzoną niedawno metabonomiką (47) znalazła zastosowanie w ocenie molekularnej anatomii i fizjologii komórki oraz zachodzących w niej procesów w warunkach działania na nie zewnętrznych czynników chemicznych i fizycznych. Zmiany w jednej kategorii cząsteczek mają wpływ na cząsteczki innych kategorii, np. zmiana ekspresji genu może wpływać na zawartość komórkową enzymu, który z kolei zmienia ilość metabolitu w komórce. Toksykologowie otrzymali nowe techniki badawcze, umożliwiające nie tylko odszyfrowanie, w jaki sposób czynnik toksyczny wpływa na przekazywanie informacji genetycznej, zapisanej w genach tworzących genom komórkowy, ale również poznanie jak ta informacja przetłumaczona na sekwencję aminokwasową białka może ulegać kolejnym zmianom pod wpływem tego czynnika toksycznego (7,48,49).

Uzyskiwane dzięki genomice i proteomice charakterystyczne profile ekspresji genów i białek dla danego związku chemicznego (lub grupy związków chemicznych) mogą być wykorzystane do oceny potencjału toksycznego związków chemicznych, których właściwości toksyczne nie zostały dotychczas poznane. Można tego dokonać przez porównanie profilów ekspresji genów i białek przez wcześniej już zbadane toksyny chemiczne (dane te są gromadzone w bibliotece ekspresji genów i białek) z tymi profilami, jakie wywołuje badany związek chemiczny. Duże nadzieje łączy się z wykorzystaniem pomiaru profilu ekspresji genów i białek w ocenie toksyczności nie tylko pojedynczych związków, ale również ich mieszanin. Te pomiary wydają się szczególnie przydatne w warunkach dokonywania oceny toksyczności czynników środowiskowych, występujących prawie zawsze jako złożone mieszaniny różnych związków. Zastosowanie genomiki i proteomiki w ocenie rakotwórczego działania związków chemicznych przyczyniło się do znacznego skrócenia czasu obserwacji. Charakterystyczny wzór ekspresji genów i białek jest wykrywalny w okresie obejmującym kilka godzin lub dni po podaniu związku rakotwórczego. Nie trzeba czekać miesiącami na rozwinięcie się choroby nowotworowej.

Niezwykle ważnym zagadnieniem, które powinno być rozwiązane w niedalekiej przyszłości z użyciem genomiki i proteomiki jest wpływ czynników zakłócających na wyniki pomiaru profilu ekspresji genów i białek. Takie czynniki jak nawyki żywieniowe, różnego rodzaju nałogi i zachowania zdrowotne mogą w poważnym stopniu modyfikować uzyskiwane wyniki badań, dotyczące wpływu chemicznych toksyn

środowiskowych na ekspresję genów i białek. Działania zakłócające są tu szczególnie istotne z racji bardzo wysokiej czułości pomiarowej stosowanych metod. Obecność czynnika zakłócającego może spowodować, że uzyskane spektrum ekspresji genów lub białek w odpowiedzi na tę samą toksynę będzie odmienne od tego, uzyskanego w sytuacji, kiedy czynnik ten nie występuje lub ma inny charakter. Wydaje się, że muszą być prowadzone równoległe badania wpływu toksyn środowiskowych i czynników zakłócających na sam genom komórkowy oraz na powstające produkty (mRNA i białka) jego aktywacji lub hamowania. Takie badania wskażą, które geny lub zespoły genów są wrażliwe na działanie czynników zakłócających i jak wygląda profil zmian ekspresji genów i białek, kiedy te czynniki pojawiają się w czasie badania, a jak kiedy ich nie ma.

Oczekuje się również, że genomika i proteomika powinny się przyczynić do dalszego postępu w badaniach wpływu polimorfizmu genetycznego na zachowania zdrowotne populacji ludzkiej. Zmiany w sekwencji nukleotydowej genów związane z występowaniem polimorfizmu genetycznego dotyczą nie tylko sekwencji kodujących białka, ale również sekwencji regulatorowych, odpowiedzialnych za włączanie lub wyłączanie transkrypcji genu. To powoduje, że pełny obraz wpływu polimorfizmu genetycznego na stan czynnościowy komórki można uzyskać badając jednocześnie zmiany w ekspresji zmienionych genów i ich produktów białkowych oraz w jakim stopniu te zmiany wpływają na zachowanie się innych genów i białek.

PIŚMIENNICTWO

1. Broder S., Venter J.C.: Sequencing the entire genomes of free-living organisms: The foundation of pharmacology in the new millennium. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000; 40: 97–132.
2. Ideker T., Galitski T., Hood L.: A new approach to decoding life: Systems biology. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2001; 2: 343–372.
3. Vanden Heuvel J.P.: Control of gene expression. W: Vanden Heuvel J.P., Perdew G.H., Mattes W.B., Greenlee W.F.[red.]. *Comprehensive Toxicology*. T. 14. Elsevier Science BV, New York 2002, ss. 57–79.
4. Corton Jch., Anderson S.P., Stauber A.J., Janszen D.B., Kimbell J.S., Conolly R.B.: Entering the era of toxicogenomics with DNA microarrays. *CIIT. Activities*. 1999; 19: 1–9.
5. Farr S., Dunn II R.T.: Concise review: gene expression applied to toxicology. *Toxicol. Sci.* 1999; 50: 1–9.
6. Fielden M.R., Zacharewski T.R.: Challenges and limitations of gene expression profiling in mechanistic and predictive toxicology. *Toxicol. Sci.* 2001; 60: 6–10.
7. Thomas R.S., Rank D.R., Penn S.G., Zastrow G.M., Hayes K.R., Pande K. i wsp.: Identification of toxicologically predictive gene sets using cDNA microarrays. *Mol. Pharmacol.* 2001; 60: 1189–1194.
8. Vrana K.E.: Use of microarray technologies in toxicology research. *Neurol. Toxicol.* 2003; 24: 321–333.
9. Tugwood J.D., Hollins L.E., Cockerill M.J.: Genomics and the search for novel biomarkers in toxicology. *Biomarkers* 2003; 8: 79–92.
10. Ding X., Kaminsky L.S.: Human extrahepatic cytochromes P450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in



- the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2003; 43: 149–173.
11. Waring J.F., Halbert D.N.: The promise of toxicogenomics. *Curr. Opin. Mol. Therap.* 2002; 4: 229–235.
 12. Witzmann F.A., Bauer M.D., Fieno A.M.: Proteomic analysis of the renal effects of simulated occupational jet fuel exposure. *Electrophoresis* 2000; 21: 976–984.
 13. Blackstock W.P., Weir M.P.: Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends. Biotechnol.* 1999; 17: 121–127.
 14. Gershon D.: Toxicogenomics gains impetus. *Nature* 2002; 415: 4–5.
 15. Timbrell J.A.: Biomarkers in toxicology. *Toxicology* 1998; 129: 1–12.
 16. Hamadeh H.K., Bushel P.R., Jayadev S., Martin K., DiSorbo O., Sieber S.i wsp.: Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles. *Toxicol. Sci.* 2002; 67: 219–231.
 17. Pennie W.D.: Gene expression analysis in the microarray age. W: Vanden Heuvel J.P., Perdew G.H., Mattes W.B., Greenlee W.F. [red.]. *Comprehensive Toxicology. T. 14.* Elsevier Science BV, New York 2002, ss. 527–537.
 18. Rockett J.C., Dix D.I.: DNA arrays: Technology, options and toxicological applications. *Xenobiotica* 2000; 30: 155–177.
 19. Wang Y., Rea T., Blan J., Gray S., Sun Y.: Identification of the genes responsive to etoposide-induced apoptosis: Application of DNA chip technology. *FEBS Lett.* 1999; 445: 269–273.
 20. Waring J.F., Jolly R.A., Ciurlionis R., Lum P.Y., Praestgaard J.T., Morfitt D.C. i wsp.: Clustering of hepatotoxins based on mechanism of toxicity using gene expression profiles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001; 175: 28–42.
 21. Harris H.M., Fletcher S.T., Duggen C.M., Baker V.A.: The use of genomics technology to investigate gene expression changes in cultured human liver cells. *Toxicol. In Vitro* 2001; 15: 399–405.
 22. Bartosiewicz M., Penn S., Buckpitt A.: Applications of gene arrays in environmental toxicology: Fingerprints of gene regulation associated with cadmium chloride, benzo(a)pyrene and trichloroethylene. *Environ. Health Perspect.* 2001; 109: 71–74.
 23. Bulera S.J., Eddy S.M., Ferguson E., Jatkoa T.A., Reindel J.F., Bleavins M.R.i wsp.: RNA expression in the early characterization of hepatotoxins in Wistar rats by high-density DNA microarrays. *Hepatology* 2001; 33: 1239–1258.
 24. Ruepp S.U., Tonge R.P., Shaw J., Wallis N., Pognan F.: Genomics and proteomics analysis of acetaminophen toxicity in mouse liver. *Toxicol. Sci.* 2002; 65: 135–150.
 25. Reilly T.P., Boundi M., Brady J.N., Plee-Masison C.A., Radonovich M.F., George J.W., Pohl L.R.: Expression profiling of acetaminophen liver toxicity in mice using microarray technology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 282: 321–328.
 26. Regunathan A., Glesne D.A., Wilson A.K., Song J., Nicolae D., Flores T., Bhattacharyya M.H.: Microarray analysis of changes in bone cell gene expression early after cadmium gavage in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003; 191: 272–294.
 27. Cheng R.Y.S., Zhao A., Alvord W.G., Powell D.A., Bare R.M., Masuda A., at al.: Gene expression dose-response changes in microarrays after exposure of human peripheral lung epithelial cells to nickel (II). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003; 191: 22–40.
 28. Zawia N.H.: Transcriptional involvement in neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003; 190: 177–189.
 29. Pennie W.D., Tugwood J.D., Oliver G.J.A., Kimber I.: The principle and practice of toxicogenomics: applications and opportunities. *Toxicol. Sci.* 2000; 54: 277–283.
 30. DeRisi J., Penland L., Brown P.O., Bittner M.L., Meltzer P.S., Ray M. i wsp.: Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature. Genetics.* 1996; 14: 457–460.
 31. Iacobuzio-Donahue C.A., Maitra A., Shen-Ong G.L., van Heek T., Ashfaq R., Meyer R.: Discovery of novel tumor markers of pancreatic cancer using global gene expression technology. *Am. J. Pathol.* 2002; 160: 1239–1246.
 32. Vanacker J.M., Pettersson K., Gustafsson J.A., Laudet V.: Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ER beta. *EMBO J.* 1999; 18: 4270–4279.
 33. Moller A., Soldan M., Volker U., Maser E.: Two-dimensional gel electrophoresis: a powerful method to elucidate cellular responses to toxic compounds. *Toxicology* 2001; 160: 129–138.
 34. Kennedy S.: The role of proteomics in toxicology: Identification of biomarkers of toxicity by protein expression analysis. *Biomarkers* 2002; 7: 269–290.
 35. Witzmann F.A.: Proteomic applications in toxicology. W: Vanden Heuvel J.P., Perdew G.H., Mattes W.B., Greenlee W.F. [red.]. *Comprehensive Toxicology. T. 14.* Elsevier Science BV, New York 2002, ss. 539–558.
 36. Schulz-Knappe P., Zucht H.D., Heine G., Jurgens M., Hess R., Schrader M.: Peptidomics: the comprehensive analysis of peptides in complex biological mixtures. *Combin. Chem. High Throughput Screen.* 2001; 4: 207–217.
 37. Abraham R., Kelly J., Thibault P., Benchimol S.: Post-translational modification of p53 protein in response to ionizing radiation analyzed by mass spectrometry. *J. Mol. Biol.* 2000; 295: 853–864.
 38. Apweiler R., Hermjakob H., Sharon N.: On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-Prot database. *Biochem. Biophys. Acta* 1999; 1437: 4–8.
 39. Wilkins M.R., Gasteiger E., Gooley A.A., Herbert B.R., Molloy M.P., Binza P.A.: High-throughput mass spectrometric discovery of protein post-translational modifications. *J. Mol. Biol.* 1999; 289: 645–657.
 40. Gressner A.M.: Two-dimensional electrophoretic analysis of ribosomal proteins from chronically injured liver. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1979; 17: 541–545.
 41. Lemkin P., Lipkin L., Merrill C.: Protein abnormalities in macrophages bearing asbestos. *Environ. Health Perspect.* 1980; 34: 75–89.
 42. Fountoulakis M., Berndt P., Boelsterli U.A.: Two-dimensional database of mouse liver proteins: changes in hepatic protein levels following treatment with acetaminophen or its nontoxic regioisomer 3-acetamidophenol. *Electrophoresis* 2000; 21: 2148–2161.
 43. Aicher L., Wahl D., Arce A., Grenet O., Steiner S.: New insights into cyclosporine A nephrotoxicity by proteome analysis. *Electrophoresis* 1998; 19: 1998–2003.
 44. Chen S., Cai L., Li X., Liu S.: Low-dose whole body irradiation induces alteration of protein in mouse splenocytes. *Toxicol. Lett.* 1999; 105: 141–152.
 45. Pipkin J.L., Hinson W.G., Young J.F., Rowland K.L., Shaddock J.G., Tolleson W.H.: Induction of stress proteins by electromagnetic fields in cultured HL-60 cells. *Bioelectromagnetics* 1999; 20: 347–357.



46. Weinreb O., van Boekel M.A., Dovart A., Bloemendal H.: Effect of UV-A light on the chaperone-like properties of young and old lens alpha-crystallin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; 41: 191–198.
47. Robertson D.G., Reily M.D.: Metabonomic technology as a tool for rapid throughput in vivo toxicity screening. W: Vanden Heuvel J.P., Perdew G.H., Mattes W.B., Greenlee W.F. [red.]. *Comprehensive Toxicology*. T. 14. Elsevier Science BV, New York 2002, ss. 583–610.
48. Smith L.: DNA microarrays and development. *Hum. Mol. Genet.* 2003; 12 (Supl. 1): 1–8.
49. Tennant R.W. The National Center for Toxicogenomics: Using new technologies to inform mechanistic toxicology. *Environ. Health Perspect.* 2002; 110: A8–A10.

