



Metabolomika – narzędzie w genomice funkcjonalnej i biologii systemów

Maciej Stobiecki

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

Metabolomics – a tool in functional genomics and systems biology

Summary

The concept of metabolomic studies has been developed during the last decade. Comprehensive analysis of primary and secondary metabolites in living organisms grown under genetic and environmental stresses may deliver interesting information about the status of the studied microorganisms, plants or animals. The metabolome analysis may be performed using different methodical approaches and various physicochemical methods may be applied for identification of low molecular compounds. Due to huge sets of data collected during the metabolomic studies, different statistical calculations and bioinformatic technologies are used for the presentation and interpretation of the results.

Key words:

systems biology, functional genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics, biotechnology.

1. Wprowadzenie

Metabolomika jest rozwijającą się w ostatniej dekadzie dziedziną wiedzy, w której głównym celem jest identyfikacja oraz analiza ilościowa (zmian ilościowych) niskocząsteczkowych produktów naturalnych – metabolitów pierwotnych i wtórnych, które tworzą metabolom w organizmach żywych. Połączenie informacji uzyskiwanych na poziomie metabolomu z danymi uzyskiwanymi w ramach innych technologii genomiki funkcjonalnej (genomika, transkryptomika i proteomika), a także na poziomie regulacji procesów oraz przepływów substancji na poziomach

Adres do korespondencji

Maciej Stobiecki,
Instytut Chemii
Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań.

biotechnologia

2 (85) 54–64 2009

subkomórkowych (transport poprzez membrany) pozwoli na zrozumienie mechanizmów i określenie przebiegu procesów życiowych w pojedynczych komórkach jak i na poziomie całego organizmu (1-3). Obecnie prowadzone są intensywne prace badawcze na wszystkich z wymienionych poziomów, integracja zbieranych olbrzymich zestawów danych wymaga zastosowania zaawansowanych metod bioinformatycznych. W celu porównywania wyników uzyskiwanych w różnych zespołach, wymagana jest standaryzacja metod hodowli oraz zbierania materiału biologicznego, przygotowania próbek do analiz oraz wykorzystania różnych metod instrumentalnych do analizy jakościowej oraz ilościowej przygotowanych próbek. Kontynuowanie interdyscyplinarnych badań na wszystkich wymienionych poziomach na bazie metodologii nauk biologicznych pozwoli w przyszłości na całościowe zrozumienie skomplikowanych zależności zachodzących w systemach biologicznych.

Problemy rozwiązywane podczas analizy metabolomu dotyczą również, a może przede wszystkim, zagadnień z zakresu inżynierii genetycznej i biotechnologii mikroorganizmów (bakterii i grzybów, w tym drożdży) oraz roślin pod kątem ich przystosowania lub odporności na stres abiotyczny i biotyczny, a także wykorzystania tych organizmów do produkcji biologicznie aktywnych produktów naturalnych. W przypadku ludzi zwraca się uwagę na możliwości znalezienia biomarkerów stanów chorobowych lub też monitorowania metabolizmu leków lub ksenobiotyków. Olbrzymie zainteresowanie budzi także monitorowanie produktów naturalnych przyswajanych w diecie, a także określanie ich wpływu na zdrowie człowieka.

Analiza jakościowa i ilościowa możliwie całej puli metabolitów w połączeniu z badaniami na innych poziomach molekularnych (genom, transkryptom, proteom) pozwala na rozwiązanie wielu problemów badawczych według koncepcji biologii systemów. Należy jednak pamiętać, że wzrost poziomu mRNA (transkryptom) nie zawsze jest skorelowany z poziomem syntezy białek (proteom) (4), a także nie wszystkie białka ulegające ekspresji są aktywne enzymatycznie (5). Zjawiska te są związane z regulacją poziomów czynników transkrypcyjnych (6-8) i różnego rodzaju związków sygnalnych wiążących się z białkami (9).

Badanie puli metabolitów wtórnych w organizmach żywych sięga początków lat 70. ubiegłego wieku. Horning wraz ze wsp. zaproponowali wykorzystanie układów chromatograf gazowy spektrometr mas do analizy steroidów, kwasów karboksylowych oraz kwaśnych metabolitów w płynach fizjologicznych (10,11). Tego rodzaju podejście zostało wykorzystane w latach późniejszych do opracowania metody sprawdzania występowania określonych defektów genetycznych u noworodków, na podstawie profili metabolitów w próbkach moczu (12). W tego rodzaju badaniach stosuje się systemy chromatograf cieczowy-spektrometr mas (LC-MS), bądź chromatograf gazowy-spektrometr mas (GC-MS). Od momentu zaproponowania i opracowania koncepcji profilowania metabolitów możliwości instrumentalne uległy olbrzymim zmianom, zarówno na poziomie rozdziału skomplikowanych mieszanin substancji (systemy chromatograficzne) jak i identyfikacji poszczególnych składników tychże mieszanin, poprzez wykorzystanie różnych metod detekcji składników

próbek: spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), spektrometria mas (MS), spektrofotometria w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT IR), spektrofotometria w ultrafiolecie (UV), spektroskopia Ramana. Sporadycznie są również stosowane inne metody identyfikacji związków. Należy podkreślić, że wymienione metody detekcji związków oparte są na wykorzystaniu różnych zjawisk fizykochemicznych. Głównymi czynnikami, które trzeba brać pod uwagę przy doborze metod instrumentalnych, używanych w badaniach metabolitów jest czułość, specyficzność oraz zakres dynamiczny określający możliwość detekcji (identyfikacji) związków występujących w różnych zakresach stężeń (13). Uzyskanie zakresu dynamicznego 4 rzędów wielkości (10^4) jest obecnie osiągalne. Należy podkreślić również, że selektywność identyfikacji substancji w stosowanych metodach detekcji jest odwrotnie proporcjonalna do czułości urządzenia. Tego rodzaju zależność stwarza poważne problemy związane z identyfikacją substancji i ich analizą ilościową w próbkach badanego materiału biologicznego.

2. Metabolomika – podstawowe definicje

Definicja metabolomu została podana przez Oliviera i wsp. w czasie prac nad składem metabolitów w komórkach drożdży i wykorzystaniem tych danych w genomice funkcjonalnej (14), i równolegle przez Tweeddale przy okazji publikowania wyników badań metabolitów podczas analizy fenotypowej komórek *Escherichia coli* (15). Trzy lata później Fiehn wprowadził bardziej jasną definicję analizy metabolomu z określeniem różnego rodzaju metod stosowanych w analizie metabolitów obecnych w komórkach (16). Metabolomem nazywamy całą pulę niskocząsteczkowych produktów naturalnych syntetyzowanych w organizmie żywym znajdującym się pod wpływem określonych czynników zewnętrznych. Istotną rolę profilowania metabolitów w badaniach z zakresu genomiki funkcjonalnej przedstawił również Willmitzer i wsp. w swoim artykule opublikowanym w roku 1999 (17).

Pojęcia „metabolomika” i „metabonomika” w chwili ich utworzenia stosowano wymiennie, jednak ostatnio zostały podjęte próby specyficznego rozróżnienia znaczenia dla obu definicji. Celem metabolomiki w badaniach organizmów żywych (systemów biologicznych) jest katalogowanie i oznaczanie ilościowe maksymalnie wielu związków chemicznych w analizowanych próbkach materiału biologicznego. Natomiast w zakres metabonomiki wchodzi badania dotyczące profilowania zmian ilościowych i jakościowych metabolitów zasadniczo w organizmie człowieka (ewentualnie zwierząt modelowych) w odpowiedzi na stresy: choroba, działanie substancji toksycznych lub o działaniu farmakologicznym lub ewentualnie będące odpowiedzią na zmiany w przyjmowanej diecie (18).

Dyskusowanie składu całego metabolomu w danym mikroorganizmie, roślinie i zwierzęciu jest obecnie niemożliwe. W celu uproszczenia stopnia skomplikowania omawianego problemu można się ograniczyć do pojedynczego organu, tkanki albo

też płynów fizjologicznych (mocz, krew i płyn mózgowo-rdzeniowy), albo jednego rodzaju komórek. Szacuje się, że w pojedynczym metabolomie może występować od 1500 metabolitów w komórkach mikroorganizmów i około 2500 metabolitów pierwotnych i wtórnych w organizmach zwierzęcych, z kolei w tkankach roślinnych szacuje się, że może być obecnych od 5000 (*Arabidopsis thaliana*) do kilkunastu tysięcy metabolitów (3,19). Z kolei w całym królestwie roślin całkowitą liczbę obecnych metabolitów wtórnych szacuje się na około 200 000 do 250 000 (20,21). Współcześnie wykorzystywane metody instrumentalne pozwalają na identyfikację oraz analizę ilościową niewielkiej części metabolitów występujących w badanym organizmie. Maksymalna liczba związków organicznych identyfikowanych w trakcie pojedynczej analizy nie przekracza kilkuset (22-24). W przypadku stosowania systemów GC-MS lub LC-MS, w celu identyfikacji maksymalnej liczby metabolitów muszą być stosowane odpowiednie programy umożliwiające dekonwolucję (podział) nakładających się widm pochodzących od związków, nie rozdzielonych podczas analizy chromatograficznej z powodu bardzo zbliżonej budowy (związki izomeryczne) lub spowodowanych innymi przyczynami, np. podobnymi właściwościami. Skład metabolomu poszczególnych gatunków odzwierciedla unikatowy przebieg procesów fizjologicznych i biochemicznych zachodzących w czasie ich rozwoju (ontogenezy) oraz określa wpływ czynników zewnętrznych na przebieg procesów życiowych. Analiza metabolitów pierwotnych i wtórnych pozwala na określenie fenotypu biochemicznego danego organizmu jako całości lub ewentualnie poszczególnych tkanek lub zdefiniowanych typów komórek.

Tabela

Podział podejść metodycznych stosowanych w metabolomice

1	2
Podjęcia metodyczne	Stosowane metody instrumentalne
metabolomika (ang. <i>metabolomics</i>) analiza metabolomiczna	GC (GC ²) sprzężona z MS LC ⁿ -MS LC = HPLC lub UPLC MS = MS ⁿ or FT ICR CE-MS
profilowanie metabolitów (ang. <i>metabolite profiling</i>)	LC-MS CE-MS LC-NMR LC-EC (detektor elektrochemiczny)
celowana analiza metabolitów (ang. <i>metabolite target analysis</i>)	GC-MS LC-MS CE-MS

1	2
metabolomiczny odcisk palca (ang. <i>metabolic fingerprinting</i>)	NMR DIMS – bezpośrednia infuzja próbki do komory jonizacyjnej spektrometru mas LDI-MS – desorpcyjna jonizacja laserm MSLDI-MS – desorpcyjna jonizacja laserm z supresją matrycy FT IR – spektroskopia w podczerwieni z transformacją Furiera spektroskopia ramanowska
metabolomiczny odcisk stopy (ang. <i>metabolic footprinting</i>)	metody analityczne (jw.)
analiza przepływu metabolitów (ang. <i>metabolite flux analysis</i>) lub fluksomika (ang. <i>fluxomics</i>)	NMR DIMS LC-MS GC-MS

Tabela przygotowana na podstawie publikacji (18).

Do analizy metabolomów są wykorzystywane różne podejścia metodyczne (tab.): 1) jednoczesna analiza możliwie jak największej liczby metabolitów z równoległą ich identyfikacją i oznaczeniem ilościowym składników próbki – metabolomika (ang. *metabolomics*) lub analiza metabolomiczna; 2) celowana analiza metabolitów (ang. *metabolite target analysis*) – w tym podejściu celem analiz są metabolity powstające w określonym szlaku metabolicznym lub specyficznych enzymów będących przedmiotem badań; 3) profilowanie metabolitów (ang. *metabolite profiling*) przedmiotem analizy jest zdefiniowana grupa metabolitów (np. lipidy), tego rodzaju podejście jest szczególnie często wykorzystywane w badaniach medycznych (klinicznych i farmakologicznych); 4) metabolomiczny odcisk palca (ang. *metabolic fingerprinting*) polega na klasyfikacji analizowanych próbek na podstawie rejestrowanych sygnałów w widmach zapisywanych przy wykorzystaniu wybranej metody instrumentalnej zapewniającej dużą szybkość wykonania analiz, bez konieczności rozdziału oraz identyfikacji poszczególnych składników obecnych w badanych próbkach, pomijając podczas analiz etap rozdziału mieszanin, tego rodzaju podejścia stosuje się w czasie badań metabolomów wewnątrzkomórkowych; 5) metabolomiczny odcisk stopy (ang. *metabolic footprinting*) w tych metodach są używane identyczne techniki analityczne co w przypadku metabolomicznego odcisku palca, jednakże analizie poddawane są substancje wydzielane z komórek do medium pozakomórkowego, badanego w stanach chorobowych, w wyniku działania leków lub substancji toksycznych. Podczas realizacji tego rodzaju projektów możliwe jest również stosowanie technik chromatograficznych (chromatografia gazowa, chromatografia cieczowa); 6) analiza przepływu metabolitów (ang. *metabolite flux analysis*) lub fluksomika (ang. *fluxomics*) to podejście metodyczne dotyczy głównie analizy meta-

bolitów znaczonych izotopowo (trwałymi izotopami ^{13}C i/lub ^{15}N), odpowiednie substraty wprowadzane są do kultur komórkowych lub tkankowych (ssaków, roślin drożdży, bakterii) w kolejnym kroku określone są kierunki ich transportu (18,25,26). Wymienione podejścia metodyczne pozwalają na realizację celów badawczych stawianych podczas prowadzenia badań w dziedzinie metabolomiki.

3. Metody instrumentalne stosowane podczas analizy metabolomu

Niskocząsteczkowe metabolity pierwotne i wtórne występujące w materiale biologicznym należą do różnych klas produktów naturalnych, powstają na różnych drogach aktywności enzymatycznej. Związki te mogą w niezwykle dużym stopniu różnić się właściwościami fizykochemicznymi (zakres mas cząsteczkowych, polarność, prężność par – lotność, termostabilność). Wymienione różnice powodują, że zasadniczo nie jest możliwa jednoczesna ekstrakcja z materiału biologicznego wszystkich metabolitów. Bardzo często stosuje się mieszaniny rozpuszczalników o różnej polarności, pozwala to na wydzielenie z tkanek stosunkowo szerokiej gamy produktów naturalnych (27). Sposób ich dalszych analiz zależy od celu prowadzonych badań. W wielu przypadkach nie jest konieczna identyfikacja poszczególnych składników próbek (patrz tab.), wtedy etap rozdziału substancji znajdujących się w mieszaninach może zostać pominięty. W przypadku wykorzystywania podejść opierających się na rozdziale mieszanin substancji, można stosować techniki chromatograficzne na kolumnach gazowych (28,29) lub cieczowych (23,28-30), albo też metody elektroforezy kapilarnej (29,31). W przypadku metabolitów pierwotnych najczęściej używane są chromatografy gazowe. W tych sytuacjach substancje znajdujące się w mieszaninach poddawane są reakcjom chemicznym, w których następuje zablokowanie grup polarnych w cząsteczkach (28). Dzięki temu wzrasta lotność składników analizowanych próbek i są one zdolne przepłynąć przez kolumnę chromatografu gazowego nie ulegając degradacji termicznej. Rozdziały mieszanin substancji metodą chromatografii cieczowej nie wymagają wstępnego blokowania grup funkcyjnych w cząsteczkach przed przystąpieniem do analiz. Zarówno w przypadku chromatografii gazowej jak i chromatografii cieczowej można stosować wielowymiarowe techniki chromatograficzne. W podejściu tym stosuje się kolumny o różnych właściwościach, w ten sposób stosując stopniowe wymywanie składników mieszaniny z pierwszej kolumny, na drugiej kolumnie uzyskuje się lepszy rozdział mniejszej liczby związków, a co za tym idzie precyzyjniej może działać używany detektor. Detektorami o najwyższej specyficzności są spektrometry NMR, jednak możliwości ich stosowania w układach chromatograf cieczowy-spektrometr NMR (LC/NMR) są ograniczone z uwagi na ich względnie niską czułość i wysoki koszt analizy wynikający z konieczności stosowania deuterowanych rozpuszczalników (13). W przypadku wykorzystania spektrometrów mas jako detektorów w systemach chromatograficznych, w różnych systemach należy używać odmiennych metod joni-

zacji: 1) w chromatografach gazowych stosuje się spektrometry mas z jonizacją elektronami (EI, ang. *electron ionization*); 2) w chromatografach cieczerwych oraz aparatach do elektroforezy kapilarnej używa się metody jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym: elektrozrasanie (ESI, ang. *electrospray*) lub jonizację chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI, ang. *atmospheric pressure chemical ionization*). Z kolei w przypadkach korzystania ze spektrometrów mas do jonizacji próbek mieszanin bez rozdzielów możliwe jest również użycie innych niskoenergetycznych metod wzbudzania (30). Należy podkreślić, że podczas stosowania technik spektrometrii mas z niskoenergetycznymi metodami jonizacji niezwykle istotne jest korzystanie z kolizyjnie indukowanej dysocjacji w analizatorach typu MSⁿ (CID/MS/MS, ang. *collision induced dissociation tandem mass spectrometry*) do fragmentowania jonów protonowanych lub deprotonowanych cząsteczek [M+H]⁺/[M-H]⁻ (32). Połączenie możliwości fragmentacji jonów z wysoką rozdzielczością analizatora pozwala na uzyskanie danych pozwalających na identyfikację lub ewentualnie charakterystykę strukturalną stosunkowo dużej liczby związków (33). Oba systemy detekcji są głównie wykorzystywane w spektrometrach mas stosowanych w analizach metabolomicznych do profilowania metabolitów oraz celowanej analizy metabolitów (tab.). Do analiz jakościowych oraz ilościowych poza systemami opartymi na detekcji technikami spektrometrii mas stosowane są również detektory promieniowania UV, elektrochemiczne albo fluorescencji indukowanej promieniowaniem lasera (13). Z kolei podczas analiz w metodyce odcisku palca/odcisku stopy poza systemami GC/MS, LC/MS i LC/NMR stosuje się strategie analityczne bez korzystania z technik chromatograficznych. W tych podejściach poza wysokorozdzielczymi spektrometrami mas oraz magnetycznego rezonansu jądrowego używa się również innego typu detektory: spektrofotometri w podczerwieni i Ramana. Należy podkreślić, że w związku z koniecznością umożliwienia porównywania wyników uzyskiwanych w poszczególnych laboratoriach muszą być zachowane ściśle reguły przygotowania próbek oraz procedury wykonywania analiz z wykorzystaniem poszczególnych podejść metodycznych. W celu ujednoczenia wszelkich procedur pośród badaczy zajmujących się badaniami w dziedzinie metabolomiki w 2005 r. została powołana grupa przygotowująca sformalizowane procedury analizowania metabolitów w próbkach materiału biologicznego różnego pochodzenia (33,34).

4. Analiza statystyczna i bioinformatyczna danych metabolomicznych

Ilość danych uzyskiwanych podczas analiz metabolomów jest niezwykle duża w związku z tym istnieje konieczność stosowania zaawansowanych metod statystycznych i bioinformatycznych umożliwiających interpretację jakościową oraz ilościową uzyskiwanych wyników oraz integrację tych rezultatów z wynikami uzyskiwanymi na innych poziomach molekularnych (proteom, transkryptom) (27,28,35-40). Prace eksperymentalne mające na celu na przykład określenie mechanizmów obron-

nych roślin przed stresami środowiskowymi lub mikroorganizmami chorobotwórczymi wymagają przeprowadzenia wielu doświadczeń, w których konieczne jest przebadanie wielu próbek kontrolnych i poddawanych działaniu badanego czynnika stresowego. Każdy badany obiekt musi być przygotowany w odpowiedniej liczbie powtórzeń ze względu na efekt związany z różnorodnością biologiczną, a także z powodu możliwości popełnienia błędów technicznych podczas przygotowania próbek oraz przeprowadzonych analizy instrumentalnych. Podstawowym problemem, który jest stawiany podczas opracowania wykonanych analiz jest określenie czy zestawy metabolitów w próbkach pobranych na przykład od osobników zdrowych i chorych, kontrolnych i poddawanych działaniu stresu, ulegających modyfikacji genetycznej i typu dzikiego są różne. Do tego rodzaju porównań wykorzystuje się głównie metody obliczeniowe takie jak analiza składowych głównych (PCA, ang. *principal component analysis*) lub analiza składowych niezależnych (ICA, ang. *independent component analysis*) (27,35). Po określeniu obecności odpowiednich grup w analizowanych populacjach próbek w celu ustalenia istotności różnic pomiędzy ustalonymi grupami są stosowane klasyczne metody analizy statystycznej, takie jak test t Studenta lub wielozmienna analiza wariancji (MANOVA) (27). Zastosowania metod bioinformatycznych wymagają prace prowadzące do integracji danych metabolomicznych z danymi z innych poziomów molekularnych (proteom, transkryptom, fluksom) w celu całościowego spojrzenia na przebieg procesów fizjologicznych i biochemicznych w organizmach żywych z punktu widzenia biologii systemów lub genomiki funkcjonalnej (41-44).

Ze względu na wielkość zestawów danych zbieranych podczas analiz metabolomicznych, szczególnie podczas profilowania metabolitów lub analiz metabolomicznych metodami GC/MS i LC/MS, istnieje konieczność tworzenia baz danych. Bazy zawierające informacje na temat widm masowych rejestrowanych w badaniach metabolomicznych zostały zorganizowane przez szereg laboratoriów na świecie. Jedną z nich jest baza pierwotnych metabolitów roślinnych, opierająca się na widmach GC/MS, rejestrowanych po jonizacji analitu elektronami, zorganizowana przez Instytut Maksa Plancka Molekularnej Fizjologii Roślin w Golm, Niemcy (45). Inna baza, dotycząca metabolomu pomidora oparta jest na widmach uzyskiwanych po analizach LC/MS, została opracowana na Uniwersytecie Przyrodniczym w Wageningen (46). W roku 2007 została upubliczniona baza danych Metabolomu Ludzkiego (HMDB, ang. *Human Metabolome DataBase*; <http://www.hmdb.ca/>). Zawiera ona informacje o 6500 substancjach zidentyfikowanych w organizmie ludzkim, ponadto istnieją połączenia z szeregiem innych baz danych poświęconych nie tylko metabolitom, zawierają one m.in. dane o widmach składników pożywienia roślinnego (2000) oraz leków (1500) (47).

5. Uwagi końcowe

Podsumowując, można stwierdzić, że badania metabolomu pozwalają na wiarygodne obrazowanie zmian zachodzących w organizmach żywych. Całościowe zrozumienie wszystkich procesów zachodzących w komórkach wymaga integracji badań na wszystkich poziomach molekularnych. Do realizacji tego celu jest konieczny bardzo skomplikowany aparat obliczeniowy pozwalający na korzystanie z olbrzymich zasobów wyników eksperymentalnych zbieranych podczas analiz i zgromadzonych w bazach danych. Obecnie wyciąganie ostatecznych wniosków przedstawiających całościowo problemy opisywane w biologii systemów jest jeszcze niemożliwe. Jednakże dane z analiz metabolomów mogą być wykorzystane w badaniach naukowych oraz działaniach praktycznych w wielu dziedzinach nauk biologicznych i medycznych. W pierwszej kolejności analiza niskocząsteczkowych produktów naturalnych występujących w organizmie człowieka pozwoli na oznaczenie biomarkerów stanów chorobowych, zarówno w chorobach nowotworowych jak i układu krążenia, czy też wpływu leków na przebieg procesu leczenia, bądź wpływu diety na zdrowotność określonych populacji (40,48-53). Różnego rodzaju technologie analizy metabolomów są wykorzystywane w określaniu funkcji genów, wpływu czynników stresowych (biotycznych i abiotycznych) na przebieg procesów życiowych w drożdżach, grzybach chorobotwórczych oraz bakteriach. Ma to m.in. na celu optymalizację warunków hodowli, w których mikroorganizmy wykorzystywane są w celach biotechnologicznych (37,38,54). Z kolei w przypadku badań metabolomów roślinnych uzyskane informacje mogą pomóc w otrzymywaniu odmian użytkowych bardziej odpornych na choroby lub stropy środowiskowe jak zimno czy susza, a także drzew z bardziej korzystnym stosunkiem celulozy do lignin oraz wykorzystania roślin do wytwarzania produktów naturalnych o określonej aktywności biologicznej czy wartościach odżywczych (55-58).

Opracowanie powstało w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa-Wyższego: nr 2 P06A 03029.

Literatura

1. Jones A. R., et al., (2007), *Nature Biotechnol.*, 25, 1127-1133.
2. Hirai M. Y., Yano M., Goodenowe D. B., Kanaya S., Kimura T., Awazuha M., Arita M., Fujiwara T., Saito K., (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 10205-10210.
3. Fernie A. R., Trethewey R. N., Krotzky A. J., Willmitzer L., (2004), *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 763-769.
4. Gygi S. P., Rochon Y., Franza B. R., Aebersold R., (1999), *Mol. Cell. Biol.*, 19, 1720-1730.
5. Schwab W., (2003), *Phytochemistry*, 62, 837-849.
6. Bar-Joseph Z., Gerber G. K., Lee T. I., Rinaldi N. J., Yoo J. Y., Robert F., Gordon D. B., Fraenkel E., Jakkola T. S., Young R. A., Gifford D. K., (2003), *Nat. Biotechnol.*, 11, 1337-1342.
7. Weckwerth W., Wenzel K., Fiehn O., (2004), *Proteomics*, 4, 78-83.
8. Ideker T., Thorsson V., Ranish J. A., Christmas R., Buhler J., Eng J. K., Bumgarner R., Goodlett D. R., Aebersold R., Hood L., (2001), *Science*, 292, 929-934.

9. von Mering C., Krause R., Snel B., Cornell M., Oliver S. G., Fields S., Borket P., (2002), *Nature*, 417, 399-403.
10. Horning B. C., Horning M. G., (1971), *Science*, 9, 129-140.
11. Devaux P. G., Horning M. G., Horning B. C., (1971), *Anal. Letters*, 4, 151-155.
12. Stobiecki M., (2001), *Curr. Org. Chem.*, 5, 335-349.
13. Sumner L. W., Mendes P., Dixon R. A., (2003), *Phytochemistry*, 62, 817-836.
14. Oliver S. G., Winson M. K., Kell D. B., Baganz F., (1998), *Trends Biotechnol.*, 16, 373-378.
15. Tweeddale H., Notley-McRobb L., Ferenci T. (1998), *J. Bacteriol.*, 180, 5109-5116.
16. Fiehn O., (2001), *Comp. Funct. Genomics*, 2, 155-168.
17. Trethewey R. N., Krotzky A. J., Willmitzer L., (1999), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 83-85.
18. Goodacre R., (2007), *J. Nutrition*, 137, 259S-266S.
19. Oksman-Caldentay K-M., Saito K., (2005), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16, 174-179.
20. Dixon R. A., Strack D., (2002), *Phytochemistry*, 62, 815-816.
21. Trethewey R., (2004), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7, 196-201.
22. Roessner-Tunali U., Hegemann B., Lytovchenko A., Carrari F., Bruedigam C., Granot D., Fernie A. R., (2003), *Plant Physiol.*, 133, 84-99.
23. von Roepenack-Lahaye E., Degenkolb T., Zerjeski M., Franz M., Roth U., Wessjohann L., Schmidt J., Scheel D., Clemens S., (2004), *Plant Physiol.*, 134, 548-559.
24. Sato S., Soga T., Nishioka T., Tomita M., (2004), *Plant J.*, 40, 151-163.
25. Goodacre R., Vaidyanathan S., Dunn W. B., Harrigan G. G., Kell D. B., (2004), *Trends Biotechnol.*, 22, 245-252.
26. Oldiges M., Lutz S., Pflug S., Schroer K., Stein N., Wiendahl C., (2007), *App. Microbiol. Biotechnol.*, 76, 495-511.
27. Fiehn O., (2002), *Plant Mol. Biol.*, 48, 155-171.
28. Allwood J. W., Ellis D. I., Goodacre R., (2008), *Physiol. Plant.*, 132, 117-135.
29. Issaq H. J., Abbott E., Veenstra T. D., (2008), *J. Sep. Scien.*, 31, 1936-1947.
30. Bedair M., Sumner L. W., (2008), *Trend. Anal. Chem.*, 27, 238-250.
31. Benke P. I., Pingitore F., Tang Y. J., Villa S., Keasling J. D., (2002), *Curr. Opin. Microbiol.*, 11, 233-239.
32. Griffiths W. J., Jonsson A. P., Liu S., Rai K. P., Wang Y., (2001), *Biochem. J.*, 355, 545-561.
33. Fhien O., Robertson D., Griffin J., van der Werf M., Nikolau B., Morrison N., Sumner L. W., Goodacre R., Hardy N. W., Taylor C., Fostel J., Kaddurah-Daouk R., et al., (2007), *Metabolomics*, 3, 175-178, oraz inne artykuły w cytowanym czasopiśmie (nr 3, vol. 3, 179-256).
34. Fiehn O., Wohlgenuth G., Scholz M., Kind T., Lee D.Y., Lu Y., Moon S., Nikolau B. (2008), *Plant J.*, 53, 691-704.
35. Scholz M., Gatzek S., Sterling A., Fiehn O., Selbig J., (2004), *Bioinformatics*, 20, 2447-2454.
36. Kell D. B., Brown M., Davey Y. H. M., Dunn W. B., Spasic I., Oliver S. G., (2005), *Nature Rev. Microbiol.*, 3, 557-565.
37. Villas-Boas S. G., Moxley J. F., Akesson M., Stephanopoulos G., Nielsen J., (2005), *Biochem. J.*, 388, 669-677.
38. Smedsgaard J., Nielsen J., (2004), *J. Exp. Bot.*, 56, 273-286.
39. Steinfath M., Groth D., Lisek J., Selbig J., (2007), *Physiol. Plant*, 132, 150-161.
40. Kim Y. S., Maruvada P., (2008), *Metabolomics*, 4, 105-113.
41. Kell D. B., (2004), *Curr. Opin. Microbiol.*, 7, 296-307.
42. Lange B. M., (2006), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9, 220-226.
43. Glinski M., Weckwerth W., (2006), *Mass Spectrom. Rev.*, 25, 173-214.
44. Weckwerth W., (2007), *Physiol. Plant.*, 132, 176-189.
45. Kopka J., et al., (2005), *Bioinformatics*, 21, 1635-1638.
46. Moco S., et al., (2006), *Plant Physiol.*, 141, 1205-1218.
47. Wishart D. S., et al., (2007), *Nucleic Acids Res.*, 35 (Database issue), D521-D526.
48. Kell D. B., Brown M., Davey H. M., Dunn W. B., Spasic I., Oliver S. G., (2005), *Nature Rev. Microbiol.*, 3, 557-565.

49. Griffin J. L., Kauppinen R. A., (2007), *J. Proteome Res.*, 6, 498-505.
50. van Ravenzwaay B., Coelho-Palermo Cuhna G., Leibold E., Looser R., Mellert W., Prokoudine A., Walk T., Wiemer J., (2007), *Toxicol. Letters*, 172, 21-28.
51. Kell D. B., (2007), *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 7, 329-333.
52. Holmesw E., et al., (2008), *Nature*, 453, 396-400.
53. Rezzi S., Ramadan Z., Fay L. B., Kochhar S., (2007), *J. Proteome Res.*, 6, 513-525.
54. Mapelli V., Olsson L., Nielsen J., (2008), *Trends Biotechnol.*, 26, 490-497.
55. Verpoorte R., Memelnik J., (2002), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 181-187.
56. Oksman-Caldentey K-M., Inze D., (2002), *Trends Plant Sci.*, 9, 433-440.
57. Oksman-Caldentey K-M., Saito K., (2005), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16, 174-179.
58. Harrigan G. G., (2007), *Metabolomics*, 3, 257-258.