

Proteomika v diagnostice nemocí ledvin

Tesař V.¹, Vojtová L.², Zima T.²

¹Klinika nefrologie 1. LF UK a VFN, Praha

²Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN, Praha

SOUHRN

Vyšetření moči poskytuje důležité informace o patologických změnách probíhajících v ledvinách. Dosavadní vyšetření zaměřené obvykle jen na celkovou proteinurii, eventuálně albuminurii, zdaleka nevyužívá obrovské množství informací o fyziologických a patofyziologických procesech v ledvinách, které lze potenciálně získat proteomickou analýzou vzorku moči.

Studium močového proteomu může vést k identifikaci nových markerů akutních i chronických onemocnění ledvin. Proteomická analýza dialyzátu získaného při hemodialýze může pomoci v nalezení nových uremických toxinů a markerů účinnosti očišťovacích metod. Studium proteomu jednotlivých renálních tkání (např. kůra vs dřevina) nebo buněčných populací, eventuálně buněčných kompartmentů (např. organel) může přispět k pochopení patogeneze renálních chorob a pochopení účinků farmakologické léčby. Další možností je využití cílené proteomiky (např. studium proteinů s určitými posttranslačními modifikacemi).

Klíčová slova: proteomika, ledviny, glomerulopatie, tumory ledvin, selhání ledvin.

SUMMARY

Tesař V., Vojtová L., Zima T.: Proteomics in diagnostics of renal diseases

Examination of the urine provides us with the important information about the pathological changes affecting the kidney. Routine examination usually aimed only at total proteinuria or albuminuria does not exploit the huge amount of information about the physiological and pathophysiological processes in the kidney which can be potentially derived from the proteomic analysis of the sample of the urine.

Study of the urinary proteome may lead to the identification of new markers of both acute and chronic kidney diseases. Proteomic analysis of the dialysate effluent obtained during hemodialysis may help to find new uremic toxins and markers of the effectivity of the blood purification methods. Study of the proteome of renal tissue (e. g. cortex vs. medulla), or cell populations, or cellular compartments (e. g. organelles) could contribute to the better understanding of the pathogenesis of the renal diseases and the effects of their pharmacological treatment. Another option is the use of the targeted proteomics (e. g. the study of proteins with defined posttranslational modifications).

Key words: proteomics, kidney, glomerulopathy, tumours of the kidney, renal failure.

Úvod

Proteom je tvořen proteiny a peptidy přítomnými v určitém tělesném kompartmentu. Na rozdíl od genomu je proteom specifický pro různé tkáně (např. kůra vs dřevina ledviny), části tkání (např. glomeruly), buňky (endotelové, mesangiální, viscerální a parietální podocyty, tubulární buňky v různých segmentech nefronu aj.), ale i organely (mitochondrie, endoplazmatické retikulum, lyzozomy, aj.) a mění se v odpověď na různé podněty.

Začátky proteomiky souvisejí se zavedením elektroforézy, která umožňuje rozdělení a identifikace plazmatických i močových proteinů [21], i když éra proteomiky v užším slova smyslu začíná teprve s dostupností moderní hmotnostní spektrometrie a bioinformatických technologií, které umožňují zpracovat a utřídit obrovské množství získaných informací. Proteomika se vyvíjí paralelně s rozvojem funkční genomiky, tj. analýzy transkriptů mRNA. Proteomická analýza je však obvykle proti funkční genomice dále komplikována translací jen některých transkriptů, posttranslačními modifikacemi proteinů (existencí mnoha izoform) a vznikem řady proteinových fragmentů v důsledku limitované proteolýzy.

Proteomika v nefrologii se zaměřuje zejména na studium moči vzhledem k její dostupnosti ve velkém množství bez nutnosti jakýchkoli invazivních procedur, předpokládanému úzkému vztahu změny složení moči k nemocem ledvin a močových cest a relativně dobré stabilitě bílkovin v moči ve srovnání s krví (v moči skladované 6 hodin při pokojové teplotě, 3–4 dny při teplotě 3–4 °C, respektive několik let při teplotě -20 °C nenastávají prakticky žádné změny ve složení proteinů) [22] – obrázek 1. Spoléhání se na stabilitu vzorků by ale rozhodně nemělo znamenat, že nebude věnována dostatečná pozornost standardizaci odběru vzorku, jeho skladování a dalšímu zpracování. Při vyšetřování plazmy (raději než séra) je nutno zabránit působení proteáz, které dávají velmi rychle vzniknout řadě degradačních produktů [16] – obrázek 2.

Základními cíli využití proteomiky v nefrologii jsou: pomocí identifikace močového (nebo renálního, či dokonce buněčného proteomu) přispět k lepšímu pochopení patogeneze nemocí ledvin, identifikovat nové markery nemocí ledvin, umožňující jejich časnou detekci, odhad stupně ireverzibilního poškození a prognózy onemocnění a monitorování aktivity renálního onemocnění (odpovědi na léčbu).

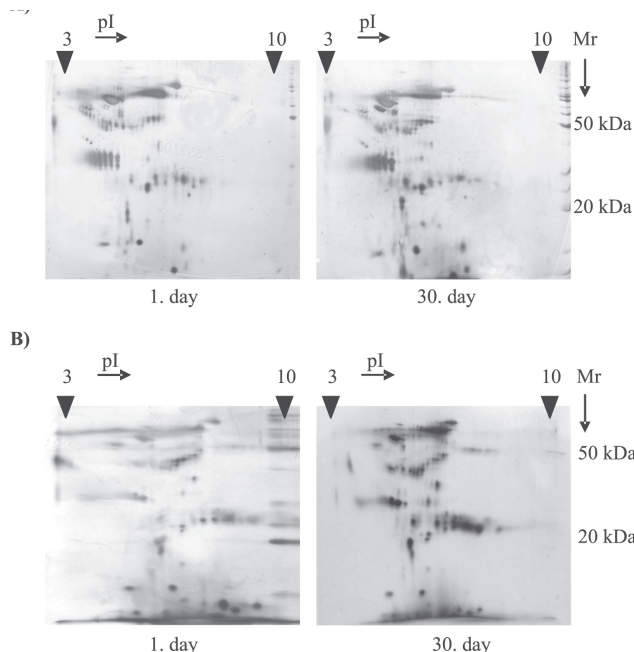


Fig. 1. Comparison of 2D electrophoreograms analysed in different intervals after sample collection

The urine samples were analysed immediately after collection using 7 cm polyacrylamide strips pH 3-10L by the IEF method, where 20 µg of total protein amount were loaded on each strip. The proteins were next separated by SDS-PAGE in 12% polyacrylamide gel and detected by silver [29].

Technické aspekty proteomiky

Při proteomickém vyšetření dosáhneme nejprve rozdělení proteinů přítomných v daném vzorku buď (obvykle) v pevné fázi (dvojměrnou elektroforézou v polyakrylamidovém gelu – PAGE – polyacrylamide gel electrophoresis), nebo tekuté fázi (vysokoučinná kapalinová chromatografie – high performance liquid chromatography – HPLC) s následnou identifikací jednotlivých proteinů zastoupených v proteomickém profilu některou metodou ionizace, např. MALDI (matrix associated laser desorption/ionization), SELDI (surface-enhanced laser desorption/ionization) nebo ESI (electrospray ionization) spojené s hmotnostní spektrometrií (MS – mass spectrometry). Omezený počet proteinů, respektive protilátek proti renálním proteinům lze také identifikovat pomocí proteinových sad (arrays). Existují dva základní proteomické přístupy [25]:

1. Srovnávání proteomických spekter příznačných pro různá renální onemocnění, jejich aktivitu a chronicitu, bez snahy jednotlivé proteiny identifikovat (určení proteomického otisku prstu – „fingerprintu“ – daného onemocnění).
2. Snaha o identifikaci jednotlivých proteinů, které jsou pro proteomický profil daného onemocnění (s danou aktivitou a chronicitou) relativně specifické.

Konečným cílem by mělo být definovat pro každé onemocnění (s přihlédnutím k jeho aktivitě a chronicitě) sestavu markerů („proteomický čip“), který by mohl být po validaci na dostatečně rozsáhlé skupině daných nemocných a určení senzitivity, specifity, eventuálně i pozitivní a negativní prediktivní hodnoty, použit v rutinní diagnostice nemocí ledvin.

Aplikace proteomiky na renální tkáň je komplikovaná zastoupením různých buněčných populací. U potkanů byly prokázány rozdíly v expresi různých proteinů v kůře a dřeni ledviny [Arthur et al., 2001]. U potkanů s 5/6 nefrektomií byly laserovou disekcí získány izolované glomeruly. Pomocí proteomiky byl identifikován thymosin-beta-4 jako specifický marker glomerulosklerózy [34].

Proteomika normální moči, normální močový proteom

Použití renální tkáně pro proteomické vyšetření je v klinické praxi nepraktické, mnohem výhodnější je vyšetřování močového proteomu. Kromě přímého vyšetření močového proteomu je možné moč před vlastní proteomickou analýzou rozdělit centrifugací do několika frakcí. Při pomalé centrifugaci obsahuje supernatant zejména filtrované plazmatické proteiny a proteiny secernované tubulárními buňkami. Rychlou centrifugací této frakce lze pak získat frakci obsahující exozomy (malé vezikuly s průměrem do 80 nm

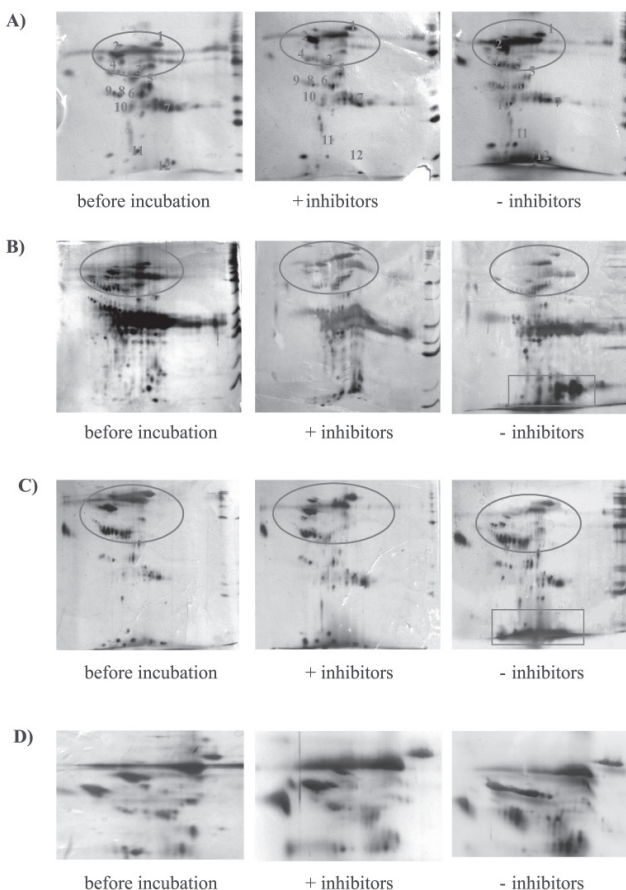


Fig. 2. Changes in the protein map in accordance to the presence of protease inhibitors in the samples of four different patients (A, B, C, D) with nephrotic syndrome. D) detailed comparison of protein map changed in the area of molecular weights higher than 30 kDa. Samples were analysed after incubation using the IEF method on polyacrylamide strips, where 20 µg of total protein amount were loaded on each strip. The proteins were next separated by SDS-PAGE in 12% polyacrylamide gel and detected by silver [29].

s buněčnou membránou), a cytosolické proteiny. Exozómy pocházejí z tubulárních buněk s příměsí exozómů profiltrovaných z krve [35].

První studie zaměřené na normální močový proteom jsou jen několik let staré [23]. V normální moči bylo zpočátku postupně identifikováno 67 různých proteinů a jejich izoform [23], respektive 113 proteinů [15]. Nejnovější studie ale identifikovaly v moči zdravých lidí více než 1500 proteinů (nebo jejich fragmentů), z nichž většinu představují membránové proteiny, což je zřejmě dáno zejména přítomností exozómů. Exozomální fetuin-A v moči byl nedávno identifikován jako možný parametr akutního poškození ledvin [35].

Močový proteom ve standardně odebraném středním proudu první ranní moči má poměrně malou intraindividuální variabilitu v jednotlivých dnech a poměrně malou variabilitu interindividuální, což je důležité pro srovnání směsných poolů zdravých močí s močí nemocných [27].

Močový proteom zdravých osob se ale vyznačuje značnou variabilitou během dne, zřejmě zejména v důsledku cvičení, příjmu potravy, cirkadiálního rytmu aj. [7, 29]. Existují významné rozdíly mezi proteomem první ranní moči a středního proudu moči [7], reprodukovatelnost výsledků tak vyžaduje dodržování standardního odběrového protokolu.

Proteomika jednotlivých segmentů nefronů

Některé novější studie se zaměřily na funkční změny proteinů v jednotlivých úsecích nefronu. Pomocí proteomické analýzy byly např. nalezeny v potkaních vnitřních medulárních sběrných kanálcích po krátkodobém podávání vazopresinu nové fosfoproteiny závislé na působení vazopresinu, např. Bclaf1, LRRC47, Rgl3, SAFB2 a na známých fosfoproteinech byla prokázána další fosforylační místa [9]. Je zřejmé, že takové studie umožňují přesněji popsat sekvenci aktivace jednotlivých proteinů jako odpověď na různé (v tomto případě hormonální) podněty.

V buňkách proximálního tubulu potkanů vystavených metabolické acidóze [5] byla potvrzena očekávaná zvýšená exprese glutaminázy, glutamát dehydrogenázy a fosfoenolpyruvát karboxykinázy. Kromě toho však bylo identifikováno dalších 17 zvýšeně a 16 sníženě exprimovaných proteinů. V mRNA proteinech s pozdní odpovědí byla zjištěna podobná AU sekvence jako u glutaminázy, která je citlivá na změnu pH a ovlivňuje zřejmě stabilitu mRNA pH regulovaných proteinů. Proteomika tak může pomoci lépe pochopit mechanismus odpovědi buněk proximálního tubulu na metabolickou acidózu.

Proteomika u glomerulopatií

Abnormální glykozylace molekuly IgA1 hraje důležitou roli v patogenezi **IgA nefropatie**. Proteomická analýza struktury O-glykanů potvrdila abnormální gly-

kosylaci (chybění terminální galaktózy) v séru i renální tkáni pacientů s IgA nefropatií [8]. Proteomická analýza poolované moči pacientů s IgA nefropatií prokázala významné rozdíly ve srovnání s poolovanou močí zdravých osob a umožnila první identifikaci močového proteomu u IgA nefropatie [17].

Proteomická analýza byla také využita ve snaze o nalezení stále neidentifikovaného permeabilitního faktoru, který by měl být příčinou zvýšené propustnosti glomerulární kapilární stěny pro albumin u pacientů s nefrotickým syndromem s minimálními změnami glomerulů a u **fokálně segmentální glomerulosklerózy**. Z deseti suspektních proteinů bylo šest identifikováno jako fibulin, apolipoprotein J, vitronectin, izoforma albuminu, alfa-fibrinogen a sérová proteáza asociovaná s mannanem vážícím lektin.

U potkanů s pasivní Heymannovou nefritidou (modelem lidské **membranózní nefropatie**) byla prokázána významně změněná exprese pomocí MALDI-TOF identifikovaných 18 proteinů (např. preprohaptoglobinu, alfa-1-antitrypsinu, albuminového prekurzoru, nebo transthyretinu [14].

U pacientů s **nefrotickým syndromem** na podkladě různých primárních glomerulopatií (minimálních změn glomerulů, fokálně segmentální glomerulosklerózy a membranózní nefropatie) bylo v moči (ale nikoli v plazmě) pomocí MALDI-TOF identifikováno 72 peptidů, které odpovídaly fragmentům albuminu nebo alfa-1-antitrypsinu [3]. Jaký má vztah fragmentace albuminu k patogenezi nefrotického syndromu bude třeba objasnit dalšími studiemi.

I když jsou proteomické studie u pacientů s glomerulopatiemi teprve v počátcích, lze očekávat, že by mohly přispět k odhalení patogeneze zvýšené glomerulární permeability u těchto chorob.

Proteomika u diabetické nefropatie

Proteomická analýza ledvin OVE26 transgenní myši (model diabetické nefropatie na podkladě diabetu I. typu) identifikovala 30 proteinů exprimovaných odlišně ve srovnání s ledvinami nediabetických zvířat. Mezi těmito 30 proteiny byly zastoupeny proteázy, inhibitory proteáz, proteiny regulující apoptózu, proteiny ovlivňující odpověď na oxidační stres, proteiny vážící kalcium, proteiny ovlivňující buněčný transport a proteiny, které jsou součástí kontraktálního aparátu buňky. U 19 proteinů byla jejich změněná exprese u diabetu známá a očekávaná, v 11 případech šlo o proteiny, které v minulosti nebyly dávány do souvislosti s diabetem. Jejich identifikace tedy může přispět k odhalení další patogenetických mechanismů diabetické nefropatie [24].

Proteomické analýze byly podrobeny také membránové a cytosolické frakce lidských mesangiálních buněk vystavených sedmidennímu působení vysoké koncentrace glukózy [20]. V membránové frakci byly dysregulovány binding protein (BiP), prekurzor kalretikulinu, transmembránový protein s molekulovou hmotností 63 kD z oblasti endoplazmatického retikula

a Golgiho komplexu a beta podjednotka 4-hydroxylázy prolinu kolagenu. V cytosolickém subproteomu byly zjištěny snížené koncentrace enolázy-1, anexinu VI a gama-aktinu, zatímco koncentrace hsp70 a kalmolulinu byly zvýšeny. Dosud neznámá aktivace kalmolulinu v mesangiálních buňkách vystavených glukóze umožňuje hledání nových léků, které by mohly interferencí s kalmolulinem blokovat vstup glukózy do mesangiálních buněk a jejich poškození.

Močový proteom 112 pacientů s diabetem II. typu se významně lišil od močového proteomu 39 zdravých kontrol a další změny byly identifikovány u pacientů s mikroalbuminurií [13]. U pacientů s diabetickou nefropatií byla pomocí proteomických (a poté i imunologických) metod prokázána zvýšená močová exkrece alfa-1-antitrypsinu. Tento nálezn ale může být nespecifickým projevem zvýšené permeability glomerulární kapilární stěny.

Proteomika u tubulointersticiálních onemocnění

Proteomická analýza byla využita také k identifikaci proteinů, které jsou rozdílně exprimovány pod vlivem cyklosporinu A. U většiny pacientů s cyklosporinovou nefrotoxicitou byla prokázána snížená exprese calbindinu-D28k, renálního proteinu vázícího kalcium závislé na vitamínu D a antagonisty apoptózy, který by se tak mohl stát užitečným markerem cyklosporinové nefrotoxicity. U potkanů exponovaných olovu byla prokázána změněná exprese 76 proteinů v kůře a 13 proteinů ve dřeni ledviny [33]. Změněná exprese 4 proteinů o molekulové hmotnosti 9,75–66,4 kD v moči byla prokázána pomocí SELDI-TOF-MS u pacientů po podání radiokontrastní látky (ioxilanu). Tyto změny byly přítomny u všech pacientů po podání radiokontrastní látky, ale byly více vyjádřeny u pacientů s nefrotoxicitou po podání kontrastní látky. Jeden z těchto proteinů o molekulové hmotnosti 11,75 kD byl identifikován jako beta-2-mikroglobulin. U potkanů s tubulární nekrózou vyvolanou podáváním gentamycinu byla identifikována změněná exprese 20 proteinů, které hrají roli v Krebsově cyklu, glukoneogenezi, syntéze mastných kyselin, buněčném transportu a odpovědi na buněčný stres [10].

Proteomika u vrozených onemocnění ledvin

Močový proteom byl studován u pacientů s Dentovou chorobou (generalizovaná porucha transportu v proximálním tubulu související s mutací chloridového kanálu CLNC5). Několika různými metodami byla u těchto pacientů prokázána zvýšená močová exkrece některých proteinů vázících vitamíny, apolipoproteinů, složek komplementu a cytokinů [6].

Proteomická analýza kultivovaných lidských podocytů pacientů s Denys-Drashovým syndromem (fokálně segmentální glomeruloskleróza, Wilmsův tumor

a pseudohermafroditismus způsobené mutací transkripčního faktoru WT1) ukázala, že v podocytech nemocných byla koncentrace 4,4 % proteinů více než dvakrát větší či menší než v podocytech zdravých osob s celkovým poklesem hladin aktinu [28].

Funkční genomika a proteomika kultivovaných glomerulárních buněk s aktivovanými či inhibovanými transkripčními faktory by mohla významně přispět jak k pochopení patogeneze hereditárních nefropatií (např. syndromu nehet-česka), tak obecněji k porozumění interakcí mezi jednotlivými transkripčními faktory v glomerulárních a tubulárních buňkách.

Proteomika u cévních chorob ledvin

Proteomická analýza renálních arteriol u potkanů s Goldblattovou hypertenzí (2K, 1C) v klipované i kontralaterální ledvině ukázala rozdíly v expresi několika proteinů, např. troponinu T, jehož exprese v klipované ledvině byla snižena, snad v souvislosti s myoepitelovou transformací hladkých svalových buněk během vývoje renovaskulární hypertenze [19].

Proteomika u tumorů ledvin

Vzhledem k narůstající incidenci a často pozdní diagnostice renálního karcinomu je identifikace časných markerů tohoto onemocnění naléhavá. Proteomické analýze renálního karcinomu byla proto dosud věnována mezi nemocemi ledvin největší pozornost.

Srovnání renálního proteomu renálního karcinomu a normální renální tkáň vedlo k identifikaci několika proteinů, které nejsou v tkáni renálního karcinomu exprimovány (komplexu NADH-ubichinon oxidoreduktázy, ubichinol cytochrom c reduktázy a dvou izoform plazmatické glutathion peroxidázy). Naopak tkáň renálního karcinomu exprimovala dvě multimerické a pět monomerických forem Mn superoxidodismutázy (SOD), zatímco tkáň normální ledviny multimerické formy SOD neexprimovala a exprimovala pouze dvě monomerické formy SOD (zřejmě v důsledku posttranslačních modifikací). Tkáň renálního karcinomu a normální tkáň ledviny se také lišily v expresi izoform proteinu tepelného šoku (Hsp27). Zatímco normální tkáň ledviny exprimovala 15 izoform Hsp27, renální karcinom jich exprimoval 21, některé izoformy tedy jsou zřejmě pro renální karcinom specifické. V jiné studii bylo pomocí proteomické analýzy zjištěno, že tkáň renálního karcinomu exprimuje sníženě 5 proteinů (enoy-CoA hydratázu, alfa-glycerol-3-fosfát dehydrogenázu, aldehyd dehydrogenázu 1, aminoacylázu-1 a agmatinázu [30]. V další (podrobnější) studii byla v tkáni renálního karcinomu prokázána zvýšená exprese 32 proteinů a snížená exprese dalších 41 proteinů [26]. Tato studie částečně potvrdila některá starší pozorování (vzestup Mn-SOD, laktát dehydrogenázy-A, aldolázy A a C, pyruvátkinázy M2 a thymidin fosforylázy) a kromě toho identifikovala další dosud nepopsané změny, např. zvýšenou expresi tří zástupců rodiny anexinu a zvýšenou pro-

dukci kofilinu, faktoru, který hraje roli v depolymerizaci aktinu. Pro renální karcinom lze ve srovnání s normální tkání rovněž použít metodu pouhého srovnání proteomových profilů, další validizace těchto poznatků však bude nutná.

U renálního karcinomu byly rovněž proteomické postupy kombinovány s imunologickými technikami (SPEAR – serological and proteomic evaluation of antibody responses, [26]), s cílem identifikovat mj. ty nádorové proteiny, proti kterým organismus vytváří protilátky, eventuálně s cílem nalézt cílové molekuly pro imunoterapii nádoru. Takovými proteiny jsou např. SM22-alfa (smooth muscle protein 22-alfa) a karboanhydráza I (CA I), eventuálně i předchozími studiemi identifikovaná jiná izoforma karboanhydrázy CAXII [25]. Metodou PROTEOMEX (s využitím různé reakce tkáňových proteinů se sérem zdravých osob a nemocných s karcinomem ledviny byly jako potenciální cíle imunoterapie identifikovány cytokeratin 8, cytoskeletální tropomyozin, F-aktin kryjící protein, gama-aktin, stathmin, tubulin-alfa, tubulin-beta a vimentin [11], eventuálně některý z 9 metabolických enzymů – aldózoreduktázy, glutathion-S-transferáza P, pyrofosfatáza, nikotinamid N-metyl-transferáza, SOD1, thioredoxin, triosofosfát izomeráza 1 a ubikvitin C-terminální hydroláza.

V recentní studii vedla proteomická analýza moči pacientů s karcinomem ledviny k identifikaci 31 proteinů odlišně exprimovaných ve srovnání se zdravými kontrolami [18]. Šlo o proteiny glykolýzy, metabolismu pyruvátu, ureového cyklu, ale také proteiny aktivované či suprimované proteinem p53 a Fas.

Proteomickou analýzou bylo také možné odlišit různé typy adenokarcinomů (např. ledvin, ovaria, prsu, plic, tlustého střeva a žaludku) [2].

Proteomika u pacientů s transplantovanou ledvinou

Cílem močové proteomiky u pacientů po transplantaci ledviny by mohlo být částečné nahrazení biopsie štěpu. Srovnání močového proteomu 17 pacientů s transplantovanou ledvinou a akutní rejekcí štěpu s 15 pacienty po transplantaci ledviny bez známek akutní rejekce vedlo k identifikaci 5 peptidů s molekulovou hmotností 6,5–13,4 kD jako potenciálních markerů akutní rejekce [4]. V novější studii byla při srovnání močového proteomu pacientů po transplantaci ledvin s akutní rejekcí, stabilní funkcí štěpu, akutní tubulární nekrózou a rekurencí glomerulonefritidy prokázána existence pro rejekci specifického clusteru proteinů. Rozdíl mezi močovým proteomem osob s transplantovanou ledvinou a zdravých osob [32] mohou být způsobeny převážně vlivem imunoprese obsahující cyklosporin [7]. Akutní rejekci bylo možno pomocí močové proteomiky správně diagnostikovat u 9 z 10 pacientů [32].

Proteomickým vyšetřením moči bylo také možno odlišit pacienty s transplantovanou ledvinou se stabilní renální funkcí od pacientů s akutní rejekcí a pacientů s BK nefropatií.

Proteomika u pacientů s lehkým poškozením ledvin v souvislosti s aortokoronárním bypasseem

Vyšetření močového proteomu bylo také využito k studiu časně fáze mírného renálního poškození 12–24 hodin po aortokoronárním bypasseu [27]. V moči pacientů po aortokoronárním bypasseu byly nalezeny 4 proteiny s molekulovou hmotností 3–20 kD a jeden s molekulovou hmotností nad 20 kD, které vysoce specificky odlišily pacienty od zdravých kontrol.

Proteomika u pacientů s akutním selháním ledvin

Proteomika (dvojměrná PAGE kombinovaná s MALDI-TOF) byla rovněž aplikována na studium ultrafiltrátu získaného při kontinuálních mimotělních metodách u pacienta s akutním selháním ledvin v důsledku pooperační akutní tubulární nekrózy [12]. Z 196 proteinů bylo 47 identifikováno. Šlo o mnohočetné izoformy 10 různých proteinů – albuminu, apolipoproteinu A-IV, beta-2-mikroglobulinu, litostatinu, serinové proteázy 2 asociované s manózu vázící lektin, protein vázící retinol, transferin, transtretin, vitamin D vázící protein a Zn-alfa-2-glykoprotein. Význam odstraňování těchto bílkovin v ultrafiltrátu zůstává nejistý, je pravděpodobné, že jejich zastoupení je určováno především velikostí molekuly a propustností filtru.

Proteomika u pacientů s chronickým selháním ledvin

Proteomických metod lze rovněž využít u pacientů s chronickým selháním ledvin k hledání potenciálních uremických toxinů. Zastoupení proteinů obsažených v ultrafiltrátu uremické plazmy bylo srovnáno se zastoupením proteinů v normální poolované plazmě [31]. Bylo identifikováno celkem 21 izoform celkem 6 různě exprimovaných proteinů – beta-2-mikroglobulinu, alfa-1-antitrypsinu, komplexu albuminu s myristovou a trijodobenzoovou kyselinou, faktoru D alternativní cesty aktivace komplementu, A řetězce cystatinu C a retinol vázícího proteinu. Proteomové profily ultrafiltrátu získaného filtrací přes tři různé membrány (acetát celulózy, polysulfon a polyarylethersulfon-polyamid) byly rozdílné.

Při srovnání spektra polypeptidů v dialyzátu získaném při dialýze přes vysokopropustnou (high-flux) vs nízkopropustnou (low-flux) dialyzační membránu byly podle očekávání větší polypeptidy (nad 10 kD) nalezeny pouze v dialyzátu získaném při použití vysokopropustné membrány, zatímco (již ne tak očekávaně) některé menší polypeptidy byly přítomny jen při použití nízkopropustné membrány. Detailnější analýza polypeptidů přítomných pouze v uremickém ultrafiltrátu ukázala např. přítomnost fragmentu slinného proteinu bohatého na prolin a alfa-fibrinogen.

Závěr

Dosavadní studie ukazují možnost aplikovat proteomický přístup i na pacienty s renálním onemocněním [25], i když detailní poznání močového proteomu je ještě poměrně vzdáleným cílem [7], jehož dosažení závisí více na standardizaci metodických přístupů a dostupnosti bioinformatických a softwarových řešení než na nových technologických pokrocích. Studium močového proteomu lze také jistě využít k nalezení markerů a sledování aktivity extrarenálních onemocnění, např. různých typů tumorů.

U většiny studovaných renálních chorob byly prokázány změny v močovém proteomu ve srovnání se zdravými jedinci, tyto změny však nejsou zcela specifické, i když některá zobecnění jsou přece jen možná. Např. metabolické enzymy jsou hlavními markery u toxických lézí (gentamycin, olovo), renovaskulární hypertenze a renálního karcinomu, zatímco u diabetické nefropatie jsou hlavními markery proteázy, inhibitory proteáz a bílkoviny regulující buněčný transport. Dosud nebyly také případné diagnostické markery u žádného onemocnění ledvin dostatečně validizovány.

Jinou důležitou aplikaci proteomiky představuje u pacientů s akutním a chronickým selháním ledvin studium proteinů a polypeptidů přítomných v dialyzátu (ultrafiltrátu) ve snaze identifikovat nové uremické toxiny a markery efektivity těchto očišťovacích metod. Další pokrok v této oblasti souvisí i se standardizací separačních postupů a optimalizací kontrolních souborů.

Další rozvoj renální proteomiky by tak mohl přinést zásadní pokrok v pochopení patogeneze renálních chorob (analýza proteomu jednotlivých renálních buněčných populací, např. v buněčné kultuře, snaha o analýzy proteomu jednotlivých buněčných kompartmentů, např. organel, analýza odpovědi jednotlivých buněk na exogenní podněty, proteomy buněk s aktivovanými či inhibovanými transkripčními faktory) a v identifikaci diagnostických a prognostických markerů, parametrů aktivity onemocnění a účinnosti farmakologické léčby i očišťovacích metod.

Další perspektivu představuje např. použití tzv. cílené proteomiky, tj. vyšetřování proteomu po odstranění některých vysoce zastoupených bílkovin, např. albuminu, soustředění na polypeptidy obsahující určité aminokyseliny nebo peptidické sekvence v N- a C-terminální části proteinů, studium proteinů s určitými posttranslačními modifikacemi (glykozylace, fosforylace, oxidace, nitrace), studium proteinů izolovaných některými purifikačními metodami, např. pomocí afinity k lektinům, koimunoprecipitace aj.).

Literatura

1. Arthur, J. M., Thongboonkerd, V., Scherzer, J. A. et al. Differential expression of proteins in renal cortex and medulla: a proteomic approach. *Kidney Int.*, 2002, 62, p. 1314–1321.
2. Bloom, G. C., Eschrich, S., Zhou, J. X. et al. Elucidation of a protein signature discriminating six common types of adenocarcinoma. *Int. J. Cancer*, 2007, 120, p. 769–775.
3. Candiano, G., Musante, L., Bruschi, M. et al. Repetitive fragmentation products of albumin and alpha1-antitrypsin in glomerular diseases associated with nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2006, 17, p. 3139–3148.
4. Clarke, W., Silverman, B. C., Zhang, Z. et al. Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis. *Ann. Surg.*, 2003, 237, p. 660–664.
5. Curthoys, N. P., Taylor, L., Hoffert, J. D. et al. Proteomic analysis of the adaptive response of rat renal proximal tubules to metabolic acidosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2007, 292, p. F140–F147.
6. Cutillas, P. R., Chalkley, R. J., Hansen, K. C. et al. The urinary proteome in Fanconi syndrome implies specificity in the reabsorption of proteins by renal proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2004, 287, p. F353–F364.
7. Fliser, D., Novak, J., Thongboonkerd, V. et al. Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2007, 18, p. 1057–1071.
8. Hiki, Y., Odani, H., Takahashi, M. et al. Mass spectrometry proves under-O-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy. *Kidney Int.*, 2001, 59, p. 1077–1085.
9. Hoffert, J. D., Wang, G., Pisitkun, T. et al. An automated platform for analysis of phosphoproteomic datasets: application to kidney collecting duct phosphoproteins. *J. Proteome Res.*, 2007, Aug 7, epub ahead of print.
10. Charlwood, J., Skehel, J. M., King, N. et al. Proteomic analysis of rat kidney cortex following treatment with gentamicin. *J. Proteome Res.*, 2002, 1, p. 73–82.
11. Kellner, R., Lichtenfels, R., Atkins, D. et al. Targeting of tumor associated antigens in renal cell carcinoma using proteome-based analysis and their clinical significance. *Proteomics*, 2002, 2, p. 1743–1751.
12. Lefler, D. M., Pafford, R. G., Black, N. A. et al. Identification of proteins in slow continuous ultrafiltrate by reversed-phase chromatography and proteomics. *J. Proteome Res.*, 2004, 3, p. 1254–1260.
13. Mischak, H., Kaiser, T., Walden, M. et al. Proteomic analysis for the assessment of diabetic renal damage in humans. *Clin. Sci. (London)*, 2004, 107, p. 485–495.
14. Ngai, H. H., Sit, W. H., Jiang, P. P. et al. Markedly increased urinary preprohaptoglobin and haptoglobin in passive Heymann nephritis: a differential proteomics approach. *J. Proteome Res.*, 2007, 6, p. 3313–3320.
15. Oh, J., Pyo, J. H., Jo, E. H. et al. Establishment of a near-standard two-dimensional human urine proteomic map. *Proteomics*, 2004, 4, p. 3485–3497.
16. Omenn, G. S., States, D. J., Adamski, M. et al. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: Results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics*, 2005, 5, p. 3226–3245.
17. Park, M. R., Wang, E. H., Jin, D. C. et al. Establishment of a 2-D human urinary proteomic map in IgA nephropathy. *Proteomics*, 2006, 6, p. 1066–1076.
18. Perroud, B., Lee, J., Valkova, N. et al. Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling. *Mol. Cancer*, 2006, 5, p. 64.
19. Pinet, F., Poirier, F., Fuchs, S. et al. Troponin T as a marker of differentiation revealed by proteomic analysis in renal arterioles. *FASEB J.*, 2004, 18, p. 585–586.

20. **Ramachandra Rao, S. P., Wassell, R., Shaw, M. A. et al.** Profiling of human mesangial cell subproteomes reveals a role for calmodulin in glucose uptake. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2007, 292, p. F1182–F1191.
21. **Seitz, W., Zimmer, E., Alberti, P. E.** Paper-electrophoretic studies on proteins in urine on normal and sick individuals. *Z. Klin. Med.*, 1953, 152, p. 196–201.
22. **Schaub, S., Rush, D., Wilkins, J. et al.** Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2004, 15, p. 219–227.
23. **Thongboonkerd, V., McLeish, K. R., Arthur, J. M., Klein, J. B.** Proteomic analysis of human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int.*, 2002, 62, p. 1461–1469.
24. **Thongboonkerd, V., Barati, M. T., McLeish, K. R. et al.** Alterations in the renal elastin-elastase system in Type 1 diabetic nephropathy identified by proteomic analysis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2004, 15, p. 650–662.
25. **Thongboonkerd, V.** Proteomic analysis of renal diseases: unraveling the pathophysiology and biomarker discovery. *Expert Rev. Proteomics*, 2005, 2, p. 349–366.
26. **Unwin, R. D., Harnden, P., Pappin, D. et al.** Serological and proteomic evaluation of antibody responses in the identification of tumor antigens in renal cell carcinoma. *Proteomics*, 2003, 3, p. 45–55.
27. **Vanhoutte, K. J., Laarakkers, C., Marchiori, E. et al.** Biomarker discovery with SELDI-TOF MS in human urine associated with early renal injury: evaluation with computational analytical tools. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2007, Jul 5, epub ahead of print.
28. **Viney, R. L., Morrison, A. A., van den Heuvel, L. P. et al.** A proteomic investigation of glomerular podocytes from a Denys-Drash syndrome patient with a mutation in the Wilms tumour suppressor gene WT1. *Proteomics*, 2007, 7, p. 804–815.
29. **Vojtová, L., Zima, T., Tesař, V., Kazderová, M.** Study of urinary proteomes in patients with nephrotic syndrome. *Folia Biol. (Praha)*, 2007, 53, p. 58–65.
30. **Walther, R., Balabanov, S., Junker, H. et al.** Proteome analysis of renal cell carcinoma to develop new strategies in diagnosis and therapy. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 2004, 42, p. 635–636.
31. **Ward, R. A., Brinklex, K. A.** A proteomic analysis of proteins removed by ultrafiltration during extracorporeal renal replacement therapy. In *Proteomics in Nephrology. Contributions to Nephrology*, vol. 141, eds. Thongboonkerd, V., Klein, J. B., Karger : Basel, Switzerland, 2004, p. 280–291.
32. **Wittke, S., Haubitz, M., Walden, M. et al.** Detection of acute tubulointerstitial rejection by proteomic analysis of urinary samples in renal transplant recipients. *Am. J. Transplant.*, 2005, 5, p. 2479–2488.
33. **Witzmann, F. A., Fultz, C. D., Grant, R. A. et al.** Regional protein alterations in rat kidney induced by lead exposure. *Electrophoresis*, 1999, 20, p. 943–951.
34. **Xu, B. J., Shyr, Y., Liang, X. et al.** Proteomic patterns and prediction of glomerulosclerosis and its mechanisms. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2005, 16, p. 2967–2975.
35. **Zhou, H., Pisitkun, T., Aponte, A. et al.** Exosomal fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int.*, 2006, 70, p. 1847–1857.

Studie je podpořena grantem GA UK č. 203434/54.

Do redakce došlo 10. 9. 2007.

Adresa pro korespondenci:
 Prof. MUDr. Vladimír Tesař, DrSc.
 Klinika nefrologie 1. LF UK a VFN
 U Nemocnice 2
 128 08 Praha 2
 e-mail: tesarv@beba.cesnet.cz