

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



Ing. Lucie Vojtová

**Studium změn proteinů u pacientů s nefrotickým syndromem a
Andersonovo-Fabryho chorobou**

Study of protein changes in patients with nephrotic syndrome and
Anderson-Fabry disease

(Disertační práce)

Školitel: Prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 17. 10. 2011

LUCIE VOJTOVÁ

.....

VOJTOVÁ, Lucie. *Studium změn proteinů u pacientů s nefrotickým syndromem a Andersonovo-Fabryho chorobou [Study of protein changes in patients with nephrotic syndrome and Anderson-Fabry disease]*. Praha, 2011. 109 s., 9 příl. Disertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky. Vedoucí práce Zima, Tomáš.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli prof. MUDr. Tomáši Zimovi, DrSc, za vedení celého postgraduálního studia a cenné připomínky a podnětné návrhy ke zpracování této práce i dalších studií. Dále děkuji prof. MUDr. Vladimíru Tesařovi, DrSc. a prof. MUDr. Linhartovi, DrSc. za stálou odbornou podporu a zajištění bezproblémového příjmu a zpracování vzorků pacientů. Mé poděkování patří RNDr. Petru Přikrylovi, Ph.D. za pomoc při identifikaci proteinů s využitím MALDI-TOF MS. V neposlední řadě patří mé díky všem kolegům z laboratoře ÚKBLD 1. LF UK za bezchybné zpracování zasláného vyšetřovaného materiálu a výzkumnému záměru MZ ČR VFN č. 64165 a grantu GA UK č. 203434/54 za pokrytí finančních potřeb našeho výzkumu.

1 Obsah

1	Obsah	- 4 -
2	Přehled zkratk	- 6 -
3	Abstrakt	- 8 -
4	Summary	- 9 -
5	Úvod	- 10 -
5.1	Ledviny	- 10 -
5.1.1	Glomerulární filtrace	- 11 -
5.2	Proteinurie	- 13 -
5.3	Glomerulopatie	- 16 -
5.3.1	Nefrotický syndrom	- 18 -
5.3.2	Membranózní nefropatie	- 19 -
5.3.3	IgA nefropatie	- 19 -
5.3.4	ANCA-asociovaná vaskulitida (AAV)	- 19 -
5.3.5	Systémový lupus erythematosus s postižením ledvin (lupusová nefritida)	- 20 -
5.3.6	Amyloidóza AL	- 20 -
5.4	Andersonova-Fabryho choroba	- 21 -
5.5	Proteomika	- 23 -
5.5.1	2D elektroforéza	- 24 -
5.5.2	MALDI-TOF MS	- 26 -
6	Cíle práce	- 29 -
7	Materiál a metodika	- 30 -
7.1	Sledované skupiny pacientů	- 30 -
7.2	Příprava vzorků moče	- 32 -
7.2.1	Koncentrování a skladování vzorků moče	- 32 -
7.3	Stanovení proteinů v moči pomocí 2D elektroforézy	- 33 -
7.4	Aplikace optimalizované techniky	- 35 -
7.4.1	Ověření stability vzorků	- 36 -
7.4.2	Separace albuminu ze vzorků	- 36 -
7.4.3	Vliv proteáz	- 37 -
7.5	Enzymatické štěpení proteinů v gelu	- 37 -
7.6	MALDI-TOF MS a identifikace proteinů	- 38 -
7.7	Statistická analýza	- 39 -
8	Výsledky	- 40 -
8.1	Zavedení 2D metodiky	- 40 -
8.1.1	Separace albuminu ze vzorku	- 40 -
8.1.2	Ověření stability vzorků	- 42 -
8.1.3	Vliv proteáz	- 44 -
8.2	Studie proteinů v moči u pacientů s nefrotickou proteinurií	- 48 -
8.3	Studie močových proteomů u pacientů s Andersonovo-Fabryho chorobou	- 50 -
8.3.1	Identifikace proteinů	- 53 -
9	Diskuse	- 56 -
9.1	Optimalizace metodiky 2D elektroforézy	- 57 -
9.2	Srovnání proteinových map u nefropatií	- 61 -
9.3	Porovnání skladby proteinů u AFD a zdravých kontrol	- 63 -
10	Závěr	- 65 -
11	Literatura	- 67 -
12	Přílohy	- 75 -

12.1	Příloha 1	- 77 -
12.2	Příloha 2	- 86 -
12.3	Příloha 3	- 95 -
12.4	Příloha 4	- 97 -
12.5	Příloha 5	- 100 -
12.6	Příloha 6	- 102 -
12.7	Příloha 7	- 104 -
12.8	Příloha 8	- 106 -
12.9	Příloha 9	- 108 -

2 Přehled zkratk

AAV	ANCA-asociovaná vaskulitida
ACE	inhibitory enzymu konvertujícího angiotenzin
ACN	acetonitril
AFD	Andersonova-Fabryho choroba
AT	blokátor receptoru angiotenzinu
BSA	bovine serum albumin, hovězí sérový albumin
CHCA	kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová
DM	diabetes melitus
DTT	dithiotreitol
ECT	extracelulární tekutina
EDTA	kyselinu ethylendiamintetraoctovou
EIS	ionizace elektrosprejem
ERT	enzyme replacement therapy, enzym substituční léčba
FSGS	fokální segmentální glomeruloskleróza
FT-MS	hmotnostní spektrometrie s Fourierovou transformací
Gb ₃	globotriaosylceramid
HD	hemodialýza
HPLC	high pressure liquid chromatography, vysokotlaká kapalinová chromatografie
HUPO	human proteome organization, organizace lidského proteomu
IEF	izoelektrická fokusace
IgAN	IgA nefropatie
LC	liquid chromatography, kapalinová chromatografie
Lyso- Gb ₃	globotriaosylsfinjosin

MALDI-TOF	matrix associated laser desorption/ionization time of flight, Ionizace laserem za přítomnosti matrice – s detektorem doby letu
MN	membranózní nefropatie
MS	mass spectrophotometry, hmotnostní spektrofotometrie
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
pI	izoelektrický bod
SELDI-TOF	surface-enhanced laser desorption/ionization TOF, Ionizace laserem za přítomnosti povrchu – s detektorem doby letu
SDS	dodecylsulfát sodný
SLE	systemový lupus erythematosus
TFA	trifluoroacetic acid, kyselina trifluoroctová
WG	Wegenerova granulomatóza

3 Abstrakt

Úvod: Závažná proteinurie může být způsobena jednak zvýšenou permeabilitou glomerulární bazální membrány, porušením struktury membrány či podocytů, tak také porušením sekrečně-reabsorpčních tubulárních procesů. Metodou 2D elektroforézy jsme analyzovali 60 pacientů s nefrotickou proteinurií a jinými diagnózami (lupusová nefritida, membranózní nefropatie, IgA nefropatie, Wegenerova granulomatóza) a 20 pacientů s Andersonovo-Fabryho chorobou (AFD), jenž je X-vázané genetické onemocnění postrádající aktivitu α -galaktozidázy A. Hlavním cílem této práce bylo nalézt možné rozdíly močových proteinů u nefropatií, mezi zdravými kontrolami a AFD pacienty a identifikovat abnormální proteiny jako potenciální biomarkery nemoci.

Metodika: Močové proteiny byly děleny metodou izoelektrické fokusace s použitím polyakrylamidových stripů (pH 3-10 lineární). SDS elektroforéza byla provedena v 12% polyakrylamidovém gelu. Proteiny byly vizualizovány stříbrem a identifikovány MALDI-TOF MS. Gely byly hodnoceny softwarem Phoretix 2D expression verze 2005.

Výsledky: Zjistili jsme, že bez přídavku inhibitorů proteáz můžeme detekovat proteolýzu se zvýšeným množstvím proteinů nacházejících se v oblasti kolem 10 kDa a sníženým množstvím proteinů vyskytujících se v oblasti kolem 50 kDa. Odstranění albuminu zlepšilo přehlednost močových proteomů. Srovnání močových map ukázalo významné změny proteinů, které jsou typické pro Andersonovu-Fabryho chorobu a nefropatie. U AFD pacientů byla nalezena glykosylace prostaglandin H2 D-izomerázy v místě Asn51 a Asn78. Pomocí MALDI-TOF MS byl identifikován albumin, transferin, alfa-1 antitrypsin a transthyretin prekurzor.

Závěr: Změny močových proteinů mohou být důležité pro diagnózu a vývoj renálního onemocnění. Močová proteomika u AFD pacientů odhalila zvýšenou sekreci některých proteinů. Předpokládáme, že pozorované rozdíly v množství a pozici prostaglandin H2 D-izomerázy na 2D gelu, mohou být spojeny s odlišnou glykosylací u AFD jedinců.

Klíčová slova: Andersonova-Fabryho choroba/ MALDI-TOF MS/ dvou rozměrná elektroforéza/ močové proteomy / nefrotický syndrom

4 Summary

Background: Heavy proteinuria may be caused by either increased glomerular basement membrane permeability or membrane or podocyte structural damage, and also by impairment of secretion-reabsorption tubular processes. In this study, 60 patients with nephrotic proteinuria and other diagnoses (lupus nephritis, membranous nephropathy, IgA nephropathy, Wegener's granulomatosis) and 20 patients with Anderson-Fabry disease (AFD), which is an X-linked genetic disorder with deficient α -galactosidase A activity, were analysed by the 2D electrophoresis method. The main aim of this work was to investigate possible differences in urine proteins in nephropathies, between healthy controls and AFD patients and to identify abnormal proteins as potential biomarkers of disease.

Methods: The urine proteins were divided by isoelectric focusing method using polyacrylamide strips (pH 3-10 linear). The second dimensional SDS electrophoresis was performed in 12 % polyacrylamide gel. The proteins were visualized by silver method and selected proteins were identified by MALDI-TOF MS. The gels were evaluated by Phoretix 2D expression software 2005.

Results: We found out that without adding protease inhibitors we can detect proteolysis, with increased quantity of proteins manifested in the area about 10 kDa and decreased quantity of proteins detectable in the area with molecular weights about 50 kDa. The separation of albumin caused higher lucidity of the urinary proteomes. The urinary maps comparison brought out that there are significant proteins' changes, which are typical for Anderson-Fabry's disease and other nephropathies and possible glycosylation at Asn51 and Asn78 sites of the prostaglandin H2 D-isomerase was detected in AFD patients. Also albumin, transferrin, alpha-1 antitrypsin and transthyretin precursor were identified by MALDI-TOF MS.

Conclusion: Changes of urinary proteins should be important for renal diagnosis and progression. AFD urinary proteomics revealed increased secretion of several proteins. We postulate that the observed difference in the amount of prostaglandin H2 D-isomerase and its position on two dimensional gels might be related to different glycosylation in AFD subjects.

Keywords: Anderson-Fabry disease/ MALDI-TOF MS/ two-dimensional electrophoresis/ urinary proteomes / nephrotic syndrome

5 Úvod

5.1 Ledviny

Funkci ledvin lze rozdělit do tří základních částí. Slouží k vylučování ve vodě rozpustných látek tělu vlastních (metabolických produktů, toxinů) i cizích z cirkulace do moči. Dále k regulaci vodní, elektrolytové a acidobazické rovnováhy a dlouhodobé regulace krevního tlaku a konečně i k produkci hormonů spojených s erytropoézou a kalciovým metabolismem. Ledviny mají významnou úlohu také v glukoneogenezi (1).

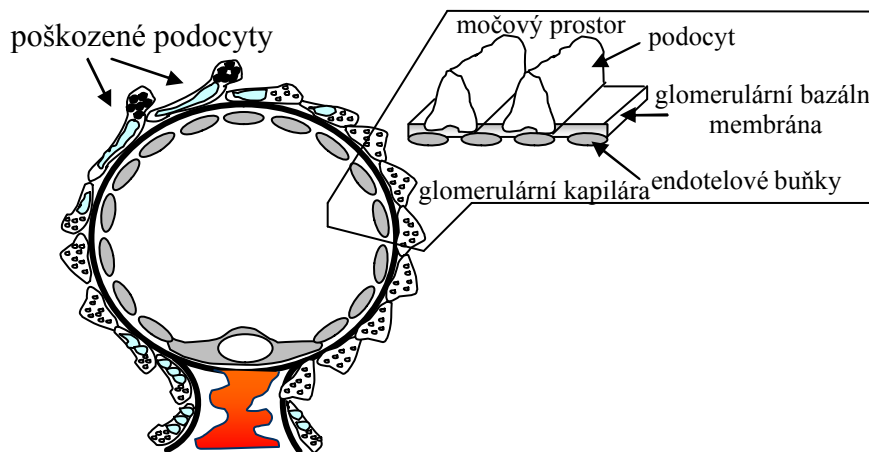
Každá lidská ledvina se skládá z 800 000 až 1 200 000 nefronů. Nefron, jako základní stavební a funkční jednotka ledviny, je tvořen dvěma částmi – glomerulem a renálním tubulem (2). Glomerulus se skládá z Bowmanova pouzdra a svazku 20 až 40 kapilárních kliček. Začátek renálních tubulů tvoří Bowmanovo pouzdro, následuje proximální tubulus, který je složen ze stočené a rovné části. Proximální tubulus dále přechází v Henleovu kličku, jenž se dělí na tenké sestupné a tenké vzestupné raménko a končí tlustým vzestupným raménkem. Dalším úsekem je distální stočený tubulus, spojovací tubulus a korový nebo dřevný sběrací kanálek (3,4). Rozeznáváme dva druhy nefronů. Prvním z nich jsou korové nefrony představující zhruba 85% nefronů v ledvině. Jejich glomeruly jsou uloženy v kůře ledvin těsně pod povrchem a mají krátké Henleovy kličky dosahující pouze do zevní zóny dřeně ledvin. Druhým typem jsou juxtamedulární nefrony, jejichž glomeruly jsou uloženy na rozhraní kůry a dřeně ledvin a Henleovy kličky zasahují hluboko do dřeně ledvin, někdy až na vrchol renální papily. Tyto nefrony hrají důležitou úlohu v protiproudovém systému, kterým ledviny koncentrují moč (5).

V glomerulech nefronů se tvoří ultrafiltrát neobsahující téměř žádné proteiny. Tato „primární moč“ se při dalším průchodu různými částmi tubulu koncentruje odnímáním vody a

její složení se mění sekrecí a resorpcí látek, až konečně přechází jako definitivní moč ze sběrného kanálku do ledvinné pánvičky.

5.1.1 Glomerulární filtrace

Glomerulární kapilární stěna je tvořena glomerulární bazální membránou a epitelovými buňkami zvanými podocyty, jejichž početné výběžky vnější stranu glomerulární membrány chrání. Výběžky podocytů jsou mezi sebou propojeny tenkou membránkou (obr. 1).



Obrázek 1. Schéma glomerulární kapilární stěny (6)

Velikost glomerulární filtrace závisí na morfologických a fyzikálních faktorech: filtrační ploše, filtrační permeabilitě a filtračním tlaku, který je dán rozdílem hydrostatického a onkotického tlaku mezi kapilárním lumenem a kapsulárním prostorem. Za fyziologických podmínek je z obou ledvin do glomerulárního filtrátu převedeno přibližně 180 l krevní plazmy/den (2, 7). K filtraci krevní plazmy dochází prostřednictvím síta složeného ze tří vrstev: první vrstvu tvoří endotelová fenestrace, druhou hustá síť glomerulární bazální membrány a třetí je tenká membrána mezi podocyty. Glomerulární kapilární stěna dělí látky na základě velikosti, náboje a tvaru (4, 8). Touto membránou jsou filtrovány plazmatické

bílkoviny (především albumin) podle jejich náboje. Výjimkou jsou plazmatické bílkoviny s molekulovou hmotností menší než 30 000 Da. Jejich povrchový negativní náboj, úměrný jejich hmotnosti, je totiž tak malý, že mohou pronikat do ultrafiltrátu prakticky bez omezení středem prostor trojrozměrné sítě negativně nabitých proteoglykanů v glomerulární bazální membráně a negativně nabitých molekul na povrchu endotelových a epitelových buněk. Za fyziologických okolností je proto koncentrace takových nízkomolekulárních plazmatických bílkovin v plazmě i ultrafiltrátu prakticky identická. K těmto volně filtrovatelným plazmatickým bílkovinám patří α -1-mikroglobulin, vazebný protein pro retinol (RBP), β -2-mikroglobulin, cystatin C a volné lehké řetězce imunoglobulinů. K filtraci plazmatických bílkovin s molekulovou hmotností větší než 150 000 Da dochází především při organických poruchách integrity glomerulární kapilární stěny. Za fyziologických okolností tyto bílkoviny do struktur glomerulární stěny nepronikají. Denní profiltrované množství plazmatických bílkovin se pohybuje kolem 10g; v moči zdravých osob je však vylučováno přibližně do 100 mg plazmatických bílkovin za den. Rozdíl, tedy přibližně 99,75 %, je vstřebán v buňkách proximálních tubulů (1, 9).

Tubulární resorpce bílkovin probíhá z největší části v pars convoluta proximálního tubulu. Nejdříve dochází k elektrostatické vazbě amino-quanidinových skupin bílkovin na receptory na povrchu mikroklků tubulárních buněk, následné endocytóze a proteolýze bílkoviny. Vazba bílkovin na tubulární receptory je zřejmě nespecifická, vazebná afinita receptorů pro jednotlivé bílkoviny významně rozdílná. Při nízké vazebné afinitě (např. pro albumin) je kapacita resorpce malá a při jeho zvýšené pasáži stěnou glomerulární kapiláry do ultrafiltrátu dochází rychle k vzestupu jeho exkrece do moči. Albumin je proto citlivým indikátorem zvýšené glomerulární filtrace. Vazebná afinita receptorů pro volně filtrovatelné nízkomolekulární bílkoviny je vysoká. Vzestup jejich koncentrací v plazmě, resp. v ultrafiltrátu se, při nepoškozených tubulech, projeví jejich zvýšenou exkrecí do moči až při

značně vysokých koncentracích. Rozdíly ve vazebné afinitě receptorů pro jednotlivé bílkoviny se významně projeví při poškození tubulárních buněk. Maximální tubulární resorpce pro albumin je udávána v rozmezí 92-99%, pro volně filtrovatelné nízkomolekulární bílkoviny až 99,97% (10). Při snížení počtu funkčních receptorů bude proto vzestup exkrece nízkomolekulárních bílkovin řádově vyšší než vzestup exkrece albuminu; bude citlivým indikátorem poškození tubulární resorpce pro bílkoviny.

Hlavními receptory podílejícími se na zpětné absorpci jsou megalin a cubilin. Tento cyklus je důležitý zejména k zamezení ztrát aminokyselin, filtrovaných ve formě bílkovin, dále hormonů a vitamínů (11, 12).

5.2 Proteinurie

Filtrace krevní plazmy v glomerulech a modifikace ultrafiltrátu v tubulech ledvin se rozhodujícím způsobem podílí na udržování pro život nezbytného objemu a složení extracelulární tekutiny (ECT). Z celkového počtu plazmatických bílkovin, které protéka ledvinami, uniká z plazmy do moči jen neuvěřitelných 0,00004 – 0,00005%. Velké molekuly (především IgG) proudí na obvodu kapilárního toku, menší v jeho středu (tzv. polarizační koncentrace); ne zcela jasným způsobem brání periferně proudící větší molekuly prostupu centrálně proudících menších vrstvou kapilárního endotelu do hlubších vrstev glomerulární stěny. Hydrodynamický tok vody a solutů stěnou kapiláry podmiňuje konvekcí v malé míře i pasáž elektronegativně nabitých molekul (především albuminu) do ultrafiltrátu. Přispívá k tomu i difuze bílkovin podle koncentračního gradientu při postupném vzestupu jejich koncentrace v průběhu glomerulární kapiláry. Za fyziologických okolností se konvekce i difuze na průniku plazmatických bílkovin do ultrafiltrátu podílejí jen málo. Významně se však oba jevy uplatní při poruchách glomerulární mikrocirkulace, tedy při poklesu perfuze ledvin s následným vzestupem filtrační frakce (3, 7).

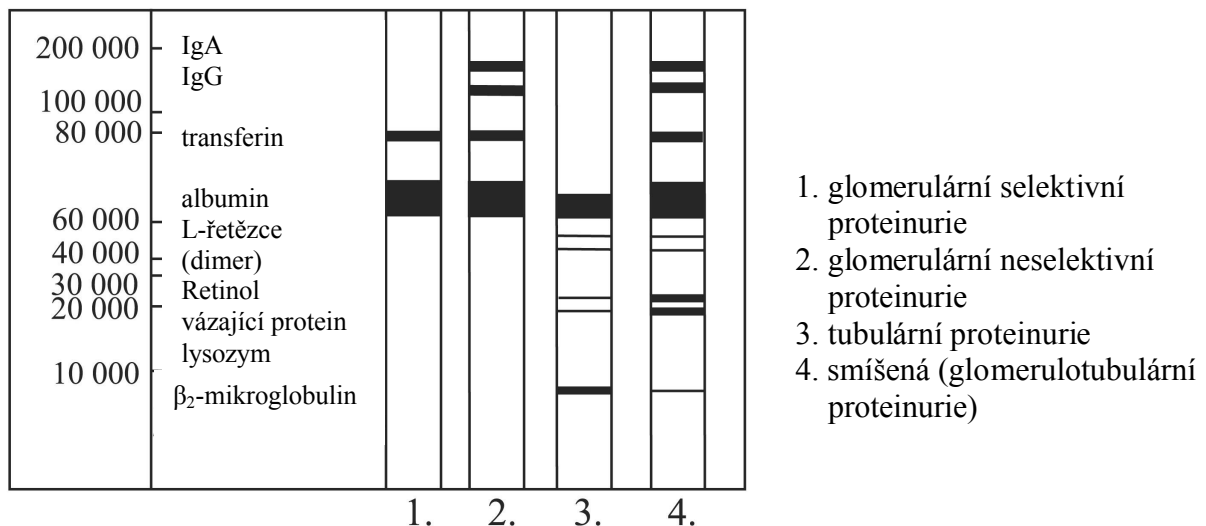
Průměrná denní exkrece bílkovin do moči je uváděna ve velmi širokém rozmezí (10-210 mg/den), nejčastěji v rozsahu 50-80 mg/den. Exkrece bílkovin do moči může navíc v průběhu dne značně ovlivnit intenzita svalové aktivity, změny krevního tlaku, složení potravy, změny glomerulární filtrace aj. Také denní exkrece nízkomolekulárních bílkovin v moči je v prvních měsících života (nedonošenci, novorozenci) zřejmě v důsledku funkční nezralosti ledvin vyšší.

Diskriminační limit pro definici patologické proteinurie doporučili v roce 1987 Robinson a Dennis exkrece 150 mg bílkovin denně. Kritérium však není přijímáno bezvýhradně. Existuje řada studií, které navrhují používání standartně zjištěných referenčních hodnot exkrece proteinů do moči. Na vzniku a trvání patologické proteinurie se může podílet několik patogenetických dějů. Zpravidla rozlišujeme několik typů proteinurií. V praxi se nejčastěji setkáváme s **glomerulární proteinurií**, jejíž příčinou je zvýšená propustnost stěny glomerulární kapiláry pro plazmatické bílkoviny z důvodu ireverzibilní organické změny struktury glomerulární stěny (zánětlivé, degenerativní onemocnění atd.). Důsledkem toho dochází ke ztrátě selektivity glomerulární filtrace plazmatických bílkovin jak podle náboje, tak i podle jejich molekulové velikosti. U těchto glomerulárních neselektivních proteinurií je dominující bílkovinou albumin o molekulové hmotnosti 67 kDa následovanou IgG imunoglobulinem. Neselektivní glomerulární proteinurie je nálezem při trvalém poklesu glomerulární filtrace, ve většině případů při všech chronicky probíhajících glomerulopatiích, u systémových vaskulitid, amyloidózy ledvin a například u rozvinuté diabetické nefropatie či fokálně segmentální glomerulosklerózy. Naopak glomerulární selektivní proteinurie je způsobena ztrátou selektivity jen podle náboje. V moči nacházíme především albumin, v malé míře bílkoviny o molekulové hmotnosti v rozsahu 30-130 000 Da (α -1-antitrypsin, transferrin, α -2-glykoproteiny). Bílkoviny s větší molekulovou hmotností, tedy zejména imunoglobuliny, se v moči neprokazují (3, 4, 9).

Selektivní glomerulární proteinurie je charakteristickým nálezem u nefrotického syndromu s minimálními změnami, vyjimečně v časných fázích u IgA nefropatie a membranózní glomerulonefritidy. **Prerenální proteinurie** vzniká při nepoškozené glomerulární filtraci a tubulární resorpci plazmatických bílkovin. Její příčinou je vysoká koncentrace bílkovin o nízké molekulové hmotnosti v plazmě, již jsou volně filtrovatelné a po překročení kapacity tubulární resorpce vylučovány do moči. Příkladem mohou být proteinurie při akutních zátěžích s přímým (popáleniny) či nepřímým (septická toxemie) poškozením tkání.

Při absolutním nebo relativním snížení tubulární resorpce volně filtrovatelných nízkomolekulárních plazmatických bílkovin vznikají **tubulární proteinurie**. Na proteinurii se v časné fázi onemocnění podílí zhruba stejným dílem nízkomolekulární bílkoviny a albumin. V dalším vývoji onemocnění, pokud při něm dochází k poškození glomerulů, se tubulární proteinurie mění na tubuloglomerulární nebo v ní glomerulární složka začíná převažovat.

Obrázek 2. Srovnání renálních typů proteinurií (6)



Tubulární proteinurie může být kompletní nebo inkompletní. U kompletních jsou vylučovány prakticky všechny mikroproteiny s molekulovou hmotností od 10 do 70 kDa, α1-antitrypsin,

albumin, β 2-mikroglobulin, retinol vázající globulin, α 1 kyselý glykoprotein. U inkompletní tubulární mikroproteinurie se v moči objeví mikroproteiny s molekulovou hmotností od 10 do 40 kDa, t.j. β 2-mikroglobulin, retinol vázající globulin, α 1 kyselý glykoprotein. U smíšené proteinurie jde o kombinaci glomerulární a tubulární proteinurie (13, 14, 15). (Obr. 2)

Postrenální proteinurie je součástí zánětlivých, nádorových a krvácivých onemocnění vývodných cest. Tato proteinurie vzniká sekrecí plazmatických bílkovin do vývodných močových cest. Prokazuje se přítomností celého spektra plazmatických bílkovin, má tedy charakter glomerulární neselektivní proteinurie. Navíc jsou v moči přítomné i plazmatické makromolekuly (α -2-makroglobulin, IgM imunoglobulin, fibrinogen a lipoproteiny), které ani při značném poškození stěny glomerulární kapiláry do ultrafiltrátu neprocházejí.(9)

5.3 Glomerulopatie

Nemoci glomerulů (glomerulopatie) představují velmi heterogenní skupinu nemocí, které lze třídit dle mnoha různých kritérií. Glomerulonefritidy jsou glomerulopatie vznikající zpravidla v důsledku aktivace imunitních mechanismů, někdy se zánětlivými změnami v glomerulech. Klinicky rozlišujeme glomerulopatie primární s izolovaným postižením ledvin a sekundární, kde postižení ledvin je jen jedním z projevů systémového, cévního, metabolického nebo genetického onemocnění postihující i jiné orgány (3, 9). Podle časového vývoje lze glomerulonefritidy dělit na akutní glomerulonefritidu (charakterizována náhlým začátkem, obvykle s postupnou úpravou renální funkce během několika týdnů), rychle progredující glomerulonefritidy (neléčené formy vedou během několika týdnů či měsíců k progredující ztrátě funkce ledvin, terapií lze však často renální funkci obnovit nebo stabilizovat) a nakonec chronické glomerulonefritidy ohrožují zejména svou pomalou (léta i desetiletí), ale soustavnou a často terapeuticky obtížně ovlivnitelnou progresí do chronického selhání ledvin. Různé glomerulopatie mají do značné míry typický močový nález, který hraje důležitou roli v rozhodování o indikaci k renální biopsii. Nefrotický

syndrom s malou až střední erytrocyturií je příznačný například pro membranózní nefropatii, nebo fokálně segmentální glomerulosklerózu, izolovaná selektivní proteinurie zase pro tzv. nefrotický syndrom s minimálními změnami.(1) Nenahrazuje ovšem bioptický nález, nedává možnost odhadnout závažnost onemocnění a jeho prognózu a nemůže být podkladem pro event. imunosupresivní léčbu. Nález v renální biopsii nadále zůstává základem pro klasifikaci glomerulopatií. Změny mohou postihovat jen některé glomeruly (fokální změny), a jen některé kapilární kličky (segmentální změny), nebo mohou být postiženy všechny glomeruly (difuzní změny) a všechny kapilární kličky v glomerulu (globální změny). Důležitým nálezem je také zvýšení buněčnosti glomerulů, které může být způsobeno jak infiltrací glomerulu krevními elementy (neutrofily, monocyty, lymfocyty) tak i zmnožením (proliferací) mezangiálních, endotelových nebo epitelových buněk. Glomerulonefritidy tak dělíme na neproliferativní (např. nefrotický syndrom s minimálními změnami, fokálně segmentální glomeruloskleróza, membranózní nefropatie), kde není buněčnost glomerulů zvýšena a na proliferativní se zvýšeným množstvím buněk v glomerulech. Klinické projevy glomerulopatií mohou být pestré. U chronických není výjimkou zcela asymptomatický průběh charakterizovaný pouze patologickým nálezem v moči, který může zůstat nerozpoznán (1, 7, 16).

Blíže jsme se v našem studiu věnovali primární glomerulopatii spojené s nefrotickým syndromem (NS), jako je fokální segmentální glomeruloskleróza. Dále membranózní nefropatii, IgA nefropatii, lupusové nefritidě, amyloidóze AL a Wegenerově granulomatóze. Zajímalo nás také vzácné geneticky podmíněné onemocnění Andersonova- Fabryho choroba, proto zde také uvádíme podrobnější charakteristiku zmíněných onemocnění.

5.3.1 Nefrotický syndrom

Nefrotický syndrom je klinicko-laboratorní syndrom charakterizovaný velkou proteinurií, hypoproteinémií, edémy, hypercholesterolémií a lipidurií. Proteinurie je způsobena zvýšenou permeabilitou glomerulární bazální membrány (změna náboje membrány), poškozením membrány, podocytů či narušením sekrečně-reabsorbčních tubulárních pochodů (6, 9). U nefrotického syndromu dosud není známo přesné složení modifikovaných či degradovaných proteinů v moči, ale předpokládá se možný toxický vliv těchto proteinů na tubulární buňky.

Mezi nejčastější primární glomerulopatie vedoucí k rozvoji nefrotického syndromu patří fokální segmentální glomerulosklerosa, idiopatická membranózní nefropatie a nefrotický syndrom s minimálními změnami glomerulů, který je hlavní příčinou nefrotického syndromu u dětí. Tyto tři nemoci jsou z 60-95% příčinou vzniku nefrotického syndromu a jeho rozšíření je závislé na věku. Nefrotický syndrom s minimálními změnami glomerulů je onemocnění glomerulů charakterizované zvýšenou permeabilitou glomerulární kapilární stěny (ztráta selektivity dle náboje) pro bílkoviny bez přítomnosti imunitních depozit v glomerulární kapilární stěně. Typická je velká proteinurie (u dospělých > 3,5 g/ 24h), obvykle selektivní s většinovým výskytem albuminu a proteinů s nižší molekulovou hmotností (albuminurie). Fokální a segmentální glomeruloskleróza (FSGS) je popsána sklerózou některých částí či přímo glomerulů, která dále pokračuje chronickým renálním poškozením. Idiopatická membranózní nefropatie je forma nefrotického syndromu pacientů středního a staršího věku. Důsledkem výskytu imunokomplexu obsahujícího převážně IgG, jenž je umístěn mezi vnější glomerulární membránou a podocyty, dochází ke zbytnění glomerulární kapilární stěny a také k porušení funkce podocytů a nakonec i ke ztrátě renální funkce.

5.3.2 Membranózní nefropatie

Membranózní nefropatie (MN) je charakterizována nefrotickým syndromem s depozicí imunokomplexů mezi epitelovými buňkami (podocyty) a bazální membránou glomerulů. Membranózní nefropatie je vzácná u dětí, u dospělých je nejčastější příčinou nefrotického syndromu (20-40%), u nemocných starších 40 let je pak příčinou nefrotického syndromu u více než 50% nemocných. U asi 30% dospělých nemocných s MN je glomerulopatie sekundární při jiném primárním onemocnění. Nejčastějšími příčinami sekundární membranózní nefropatie jsou léky, tumory, systémový lupus erythematosus a infekce (1, 3, 4).

5.3.3 IgA nefropatie

IgA nefropatie (IgAN) je charakterizována epizodami makroskopické hematurie vázané na infekci či trvalou glomerulární mikroskopickou hematurií s přítomností difúzních depozit IgA globálně v mezangiu glomerulů. IgA nefropatie je nejčastějším typem glomerulonefritid v Evropě a vyskytuje se nejčastěji v mladším a středním věku. Výrazně častěji jsou postiženi muži. IgAN je typická výraznými rozdíly v prevalenci mezi geografickými oblastmi, které by mohly být podmíněny geneticky. V jihovýchodní Asii se vyskytuje u 40-50%, v Evropě u 25% a v USA jen asi u 12% všech biopťovaných nemocných. IgA nefropatie je vzácná u černochů a Indiánů. U většiny nemocných se IgA vyskytuje sporadicky, ale byl popsán také familiární výskyt (3).

5.3.4 ANCA-asociovaná vaskulitida (AAV)

ANCA-asociované vaskulitidy se historicky dělí na tři hlavní klinicko-patologické jednotky: Wegenerovu granulomatózu, mikroskopickou polyangiitidu a syndrom Churche a Straussové. Pacienti mohou mít známky postižení glomerulárních kapilár, které způsobuje glomerulonefritidu, plicních kapilár, které vede k plicnímu krvácení, či kožních kapilár

s purpurou. Příznačnou pro tuto skupinu vaskulitid je absence depozice imunoglobulinů. Odhaduje se, že roční incidence AAV je v Evropě a Severní Americe asi 10-20 případů na milion obyvatel. Běloši jsou postiženi častěji než černoši, muži o něco častěji než ženy. Onemocnění bývá diagnostikováno převážně v páté, šesté nebo sedmé věkové dekádě, ale může se vyskytnout v kterémkoliv věku.

Wegenerova granulomatóza (WG) je systémové onemocnění charakterizované nekrózami, tvorbou granulomů a vaskulitidou horních a dolních dýchacích cest. WG je onemocnění středního věku (50 let) s poněkud častějším postižením mužů (4).

5.3.5 Systémový lupus erythematosus s postižením ledvin (lupusová nefritida)

Systémový lupus erythematosus (SLE) je pleomorfní klinicko-laboratorní syndrom, který diagnostikujeme u osob splňujících alespoň 4 kritéria American College of Rheumatology (exantém na tvářích, fotosenzitivita, vředy v ústech, postižení ledvin – proteinurie a/nebo granulární válce, neurologické poruchy aj.) SLE je asi 10 krát častější u Afroameričanek než u bělošek. SLE je u žen v době plodnosti asi 8-12 krát častější. K rozvoji onemocnění pravděpodobně přispívají estrogeny, zatímco androgeny mají vliv ochranný (3).

Pacienti mají obvykle pozitivní antinukleární protilátky, většina i protilátky proti dvojvláknové DNA (ds DNA). Patogenní role autoprotilátek nebyla u lupusové nefritidy jednoznačně prokázána. Předpokládá se, že důležitou roli v patogenezi poškození ledvin u SLE mohou hrát buď komplexy ds-DNA a protilátek proti ds-DNA nebo histony a protilátky proti nim.

5.3.6 Amyloidóza AL

Termín amyloidóza je definován morfologicky. Jako amyloid označujeme extracelulární depozici proteinových 7,5-10 nm širokých lineárních nevětvících se fibril

skládajících se ze dvou stočených filament o šířce 3 nm s pravidelnou konfigurací β -skládaného listu. Podle typu proteinového prekursoru lze rozlišit různé typy amyloidózy. Z hlediska postižení ledvin jsou důležité AA amyloidóza a AL amyloidóza (prekurzorem jsou lehké řetězce imunoglobulinů). Postihují kromě ledvin i další orgány, jako srdce, játra či střeva. Amyloidová depozita jsou zpočátku lokalizována zejména v mezangiu, podél glomerulární bazální membrány a v cévní stěně, ale také ve stěně tubulů a intersticiu ledvin. Příčinnou je převážně revmatoidní artritida (asi 70 % pacientů). Druhou nejčastější příčinnou (5-10 %) jsou chronická zánětlivá onemocnění.

Primární amyloidóza komplikuje asi 10-15% případů mnohočetného myelomu. Z klinického hlediska se u AL amyloidózy ve většině případů setkáváme s nefrotickým syndromem, kdy ztráty bílkovin do moči mohou přesahovat i 20 g/den. Také různý stupeň snížení renální funkce je přítomen u řady nemocných, 20% z nich vyžaduje v době stanovení dialýzu (1, 4, 9).

5.4 Andersonova-Fabryho choroba

Andersonova Fabryho choroba (AFD) představuje klinické a patologické projevy dědičného deficitu enzymu α -galaktozidázy A (α -gal A) (17, 18), vedoucího k intracelulárnímu hromadění neutrálních glykosfingolipidů s α -galaktosylovými terminály. Jde o onemocnění X-recesivně vázané, incidence se odhaduje na 1:40 000 (19, 20), v některých studiích 1: 3500 (20). Globotriaosylceramid (Gb_3), glykolipidový substrát enzymu α -galaktozidázy A, se postupně hromadí v postižených buňkách a tkáních pacientů, což vede k širokému spektru klinických projevů. Globotriaosylceramid selektivně ničí jak buňky endoteliální, periteliální a buňky hladkého svalstva vaskulárního systému, tak také renální epiteliální buňky, buňky myokardu a buňky nervového systému. (21, 22, 23, 24). Diagnózu AFD lze stanovit biochemicky průkazem snížených hladin pro α -gal A v plazmě

nebo leukocytech; v plazmě nebo v moči lze zjistit zvýšené hladiny globotriaosylceramidu.(6).

Aktivita α -gal A je u postižených hemizygotů obtížně detekovatelná, u varianty mírnější (kardiální), u atypických hemizygotů a u žen přenašeček bývá prokazatelná reziduální aktivita α -gal A různého stupně (22). Přesto až 80 % žen přenašeček má určité příznaky choroby a až u 20% se mohou vyskytnout život ohrožující symptomy. Proto je v poslední době zvažováno považovat toto onemocnění za X-dominantně vázané.

Klasická AFD je multisystémové onemocnění vyznačující se výrazným a potenciálně destrujícím postižením ledvin, srdce a periferního nervstva. Onemocnění se projevuje typicky u postižených mužských jedinců v dětském věku nejprve periodickými epizodami bolestí. Ovlivnění životně důležitých orgánů způsobuje u hemizygotních mužů s přibývajícím věkem smrt, zpravidla v důsledku renálních a kardiálních komplikací vyskytujících se zejména ve čtvrté a páté životní dekádě (25). Od roku 2001 je dostupná enzym-substituční léčba pomocí lidské rekombinantní α -galakatozidázy A (26, 27). Současné důkazy potvrzují, že enzym-substituční léčba je více účinná, pokud je zahájena časně, před rozvojem pokročilého poškození ledvin se zřetelnou proteinurií (28, 19). Dosud bylo stanovení exkrece Gb₃ a její koncentrace v plazmě a moči použito jako biomarker odpovědi nemoci na léčbu.

V současnosti je lyso-Gb₃ (globotriaosylsfinosin) navrhován jako slibnější nástroj. Lyso-Gb₃ je rozpustná sločenina, která se může snadno pohybovat z buňky do buňky. Narozdíl od Gb₃ postrádá hydrofobní (acyl) fragment. Lyso-Gb₃ je prakticky nedetekovatelný v plazmě zdravých jedinců, ale u pacientů s AFD je v plazmě obsažen v relativně vysokých koncentracích (29). Nicméně by bylo potřeba nalézt nový biomarker ke stanovení vážnosti onemocnění a efektivity enzym-substituční léčby (30).

Naše práce se zabývá studiem typu a skladby proteinů obsažených v moči pacientů s různými nefropatiemi. K tomuto účelu využíváme proteomické techniky jejichž přehled uvádíme v následujících odstavcích. (příloha 1, 2)

5.5 Proteomika

Termín „proteom“ byl zaveden v roce 1994 Marcem R. Wilkinsem, vedoucím bioinformatiky u firmy Proteome Systems v Sydney, pro označení veškerého proteinového komplementu kódovaného genomem. Pro tento termín, existuje mnoho definic. Většina z nich se v podstatě shoduje, že výzkum proteomu zahrnuje tři základní aktivity: identifikaci veškerých proteinů produkovaných určitou buňkou, tkání nebo organismem, definici vzájemných interakcí těchto proteinů nezbytných pro určitou biologickou funkci, a stanovení přesné trojrozměrné struktury proteinů klíčové pro identifikaci nízkomolekulárních ligandů, například látek, které mohou sloužit jako potencionální léčiva. Mezinárodní organizace HUPO (Human Proteome organization) formulovala v roce 2001 cíle proteomiky poněkud přesněji jako identifikaci všech proteinů kodovaných lidským genomem (popřípadě genomy dalších, zejména tzv. modelových organismů) s následným stanovením jejich exprese v různých buňkách daného organismu, jejich subcelulární lokalizace v různých organelách, dále jejich posttranslačních modifikací, jejich vzájemných interakcí a vztahu mezi strukturou a funkcí (31, 32).

Z hlediska počtu zkoumaných objektů se odhaduje počet lidských genů na 40 – 50 tisíc, zatímco odhad počtu všech proteinových produktů u člověka dosahuje zhruba 2 milionů. Informace uložená v genech je definována v podstatě lineární sekvencí čtyř znaků a je tedy jednorozměrná a poměrně stabilní. Naproti tomu informace uložená v proteinech je mnohorozměrná, závislá na faktorech jako alternativní splicing, posttranslační modifikace, a konečně správné sbalení proteinu vedoucí k jednoznačné trojrozměrné struktuře definující biologii každého proteinu. Časová proměnlivost proteomu (proteinové stroje, signalizační

kaskády apod.) nám poukazuje na skutečnost, že metodika pro výzkum proteomu je nesrovnatelně komplikovanější, než postupy použité při sekvenování genomů. Zatímco lidský genom byl sekvenován během relativně krátkého časového úseku, pro řešení komplexního zadání lidské proteomiky je nezbytná kombinace širokého spektra metodických přístupů od klasické chemie a biochemie proteinů až po nejnovější techniky robotického zpracování vzorků a mikroidentifikace proteinů hmotnostní spektrometrií. Je zřejmé, že uplatnění některých klasických technik proteinové analýzy bude v moderní proteomice stále více omezené. Takové techniky, které nejsou dostatečně citlivé, a neumožňují snadnou automatizaci a robotizaci jsou postupně nahrazovány novými přístupy. Mezi současné nástroje proteomiky zcela jistě patří dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, hmotnostní spektrofotometrie (MS), která měří molekulové hmotnosti látek. Za zmínku jistě stojí metoda vysokotlaké kapalinové chromatografie HPLC, která separuje proteiny na základě hydrofobicity s možnou návazností na MS. Zajímavou technikou jsou Isotopově značené afinitní značky v MS, které umožňují selektivní značení určitých aminokyselin (např. cystein) a také rychlé nalezení změny proteinových profilů. Příkladem může být označení normální zdravé buňky sondou s lehkými isotopy a nádorově transformované buňky těžkými isotopy. Získaná změna poměru píků je mírou změny poměru exprese obou proteinů (33).

Cílem naší studie bylo získat především informaci o celkovém zastoupení jednotlivých proteinů v moči. Proto jsme se věnovali technice 2D elektroforézy, která nám tuto možnost poskytuje.

5.5.1 2D elektroforéza

2D elektroforéza byla poprvé představena O'Farrellem v roce 1975. Technika dvojrozměrné polyakrylamidové elektroforézy stále zůstává díky své unikátní separační schopnosti základem mnoha proteomických projektů. Dvourozměrná elektroforéza (2D) je

moderní, široce používaná separační metoda k analýze souboru proteinů extrahovaných z buněk, tkání a jiných biologických materiálů. Technika je založena na separaci proteinů na základě dvou nezávislých vlastností ve dvou samostatných krocích.

V prvním kroku, izoelektrické fokusaci (IEF), jsou proteiny děleny na základě svých izoelektrických bodů (pI). K tomuto účelu jsou zpravidla využívány komerčně připravené polyakrylamidové stripy s imobilizovaným pH gradientem (lineární, nelineární) o různé délce (7, 11, 13, 18 a 24 cm). V naší studii byla IEF prováděna pomocí 7 cm dlouhých stripů s imobilizovaným nelineárním gradientem rozmezí pH 3-10 na přístroji Multiphor II. Proteiny jsou amfoterní molekuly nesoucí kladný, záporný nebo nulový náboj v závislosti na pH prostředí, ve kterém se nacházejí. Volný náboj proteinu je součet všech negativních a pozitivních nábojů, jejich aminokyselinových postraních řetězců a aminových- a karboxylových konců. Izoelektrický bod je takové pH, při kterém je volný náboj proteinu roven nule, tedy protein se nepohybuje v elektrickém poli. Proteiny jsou pozitivně nabitě, pokud se pohybují v prostředí o nižším pH, než je jejich pI. A naopak negativně nabitě při pH prostředí vyšším jak jejich pI. Pro samotnou IEF je přítomnost pH gradientu kritickou záležitostí. V prostředí pH gradientu a pod vlivem elektrického pole proteiny migrují do takového místa, kde mají nulový volný náboj. Proteiny s kladným volným nábojem budou putovat ke katodě s postupně klesajícím nábojem, až se zastaví v místě svého pI. Proteiny se záporným volným nábojem migrují k anodě a opět se zastaví v místě jejich nulového náboje. V případě, že by se proteiny difuzí dostaly do jiného místa, jsou ihned navráceny zpět. Tento jev se nazývá zaostřovací efekt IEF, který koncentruje proteiny v místě jejich pI a umožňuje tak dělení proteinů i podle velmi malých rozdílů náboje.

Ve druhém kroku jsou proteiny děleny v polyakrylamidovém gelu s přidavkem dodecyl sulfátu sodného (SDS-PAGE) na základě svých molekulových hmotností (Mr, relativní molekulová hmotnost). Každá spota na 2D gelu odpovídá konkrétnímu proteinu ve

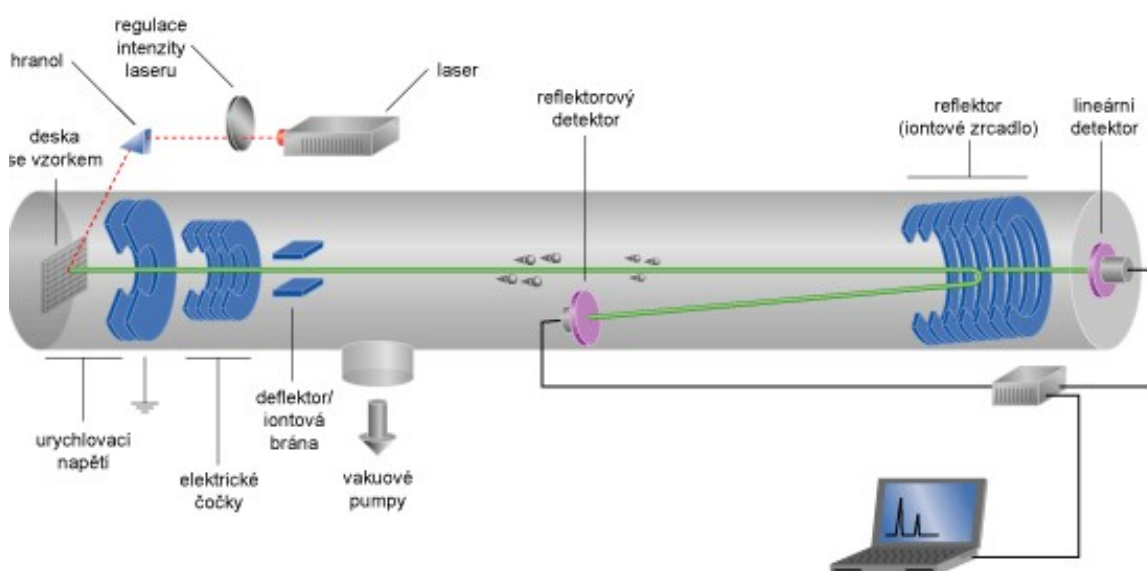
vzorku. Takto může být separováno až tisíc různých proteinů, kdy získáme informaci jak o molekulové hmotnosti, pI tak i o množství daného proteinu. Proteiny nejsou děleny na základě náboje díky přítomnosti SDS ve vzorku a gelu. SDS je anionický detergent, který ve vodném roztoku vytváří globulární micely složené z 70-80 molekul obsahujících 12 alkylových hydrofobních jednotek dotýkajících se hydrofilní sulfátové „hlavice“. Všechny bílkoviny totiž váží SDS v konstantním poměru, asi 1,4g SDS na 1g bílkoviny, a tím charakteristicky mění svou konformaci. Výsledné komplexy SDS-bílkovina pak mají stejnou hodnotu povrchového náboje a jejich konformace se do té míry unifikuje, že relativní molekulová hmotnost bílkoviny odpovídá velikosti jejího komplexu s SDS. Před samotnou analýzou se ještě přidává redukující agent dithiotreitol (DTT) k porušení všech disulfidových vazeb. Na základě jejich velikosti se každý protein pohybuje skrz gel s rozdílnou rychlostí; menší proteiny pronikají póry v gelu snadněji než větší, které se střetávají s větším odporem. Po nějakém čase (obvykle několika hodinách, doba probíhání elektroforézy závisí na velikosti proudu, který gelem prochází) jsou proteiny na základě své molekulové hmotnosti rozdělené. Menší proteiny postoupí dále než větší, které jsou blíže počátku, kam byly proteiny aplikovány. Nakonec jsou proteiny vizualizovány Coomassie blue či stříbrem (34).

5.5.2 MALDI-TOF MS

Metoda MALDI-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry) byla poprvé zavedena v roce 1985 (35). Dnes, o desítky let později, zůstala metoda oproti původnímu popisu až na malé úpravy nezměněna. Co se však dramaticky změnilo je úprava vzorku před samotnou MALDI-MS analýzou, kdy jí mnohdy předchází kapalinová či plynová chromatografická metoda nebo elektroforéza. MALDI je vedle metody ionizace elektrosprejem (EIS) jednou ze dvou ionizačních technik, které umožňují citlivou detekci velkých, netěkavých a labilních molekul pomocí hmotnostní spektrometrie. Při

použití metody MALDI se nechá studovaná látka (nebo směs látek) vykrytalovat na kovové podložní desce s tzv. matricí na vzduchu. Tou bývají deriváty nízkomolekulárních aromatických kyselin, které mohou absorbovat energii laserového záření ve viditelné nebo blízké ultrafialové oblasti například α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina; 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina; 2,5-dihydroxybenzoová kyselina. Výběr vhodné matrice je klíčovým krokem samotné analýzy. Vybírat můžeme z několika druhů matric podle toho jaké povahy je námi zkoumaný vzorek (proteiny, peptidy, nekovalentní komplexy, nukleové kyseliny). Po ozáření směsných krystalů matrix-analyt na MALDI-TOF destičce zábleskem laseru se látky prudce odpaří do vakua a ionty studovaných látek se pak již pohybují samostatně. Jsou urychleny stejnsměrným elektrickým polem. V tomto uspořádání získává většina molekul náboj + nebo -1. Techniky ESI i MALDI jsou do té míry šetrné, že při nich nedochází k fragmentaci ani velkých bílkovinných molekul. Ve vakuovém prostoru mohou sloužit k určení hmotnosti iontu tyto parametry dráhy. Jednak to může být doba letu iontu, který byl urychlen vysokým stejnsměrným elektrickým napětím, od místa ionizace k detektoru. Ionty se stejným nábojem získají při průchodu elektrickým gradientem stejnou energii ($E_{\text{pot}} = zU$, kde z je náboj a U elektrický potenciál), jejich rychlost pak závisí na hmotnosti m podle rovnice $E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} mv^2$). Tento způsob určování hmotnosti se nazývá TOF (time of flight). Dále zakřivení dráhy v magnetickém poli, kolmém na pohyb iontu. Tento klasický typ detektoru využívá skutečnosti, že dráha nabitě částice se v magnetickém poli zakřivuje tím více, čím se částice pohybuje pomaleji, čím má vyšší náboj a nižší hmotnost. V nejmodernějším provedení vytváří magnetické pole supravodivý magnet; hledají se pak takové parametry pole, při nichž jsou jednotlivé druhy iontů uvedeny na stacionární kruhovou dráhu v tzv. cyklotronu. Nebo charakteristiky pohybu iontů v prostoru, tvořeném čtyřmi nabitými tyčemi (tzv. kvadrupól). Hledá se takové rozložení elektrického pole, při němž ionty přecházejí do stacionárního vlnění; z parametrů pole lze pak určit poměr m/z jednotlivých

ionů. A konečně zachycení iontů v tzv. iontové pasti, tvořené prstencovou elektrodou (na kterou je přivedeno střídavé napětí) a vstupní a výstupní elektrodou (na které je přivedeno stejnosměrné napětí). Po nahromadění iontů v pasti se postupně zvyšuje střídavé napětí, což vede k postupnému vypuzení iontů o vzrůstající m/z_i . Na obrázku 3 je uvedeno schéma hmotnostního spektrometru na principu MALDI-TOF. Elektrická čočka a deflektor umožňují zaostřit ionty stejného poměru m/z a odklonit ty ionty, které nás v daném pokusu "nezajímají". Reflektor má stejnou elektrickou polaritu jako deska se vzorkem a obrací let iontů směrem k druhému detektoru; umožňuje zvýšit přesnost měření tím, že prodlužuje dráhu letu, a také soustředěním stejných iontů v duté části prstencovitých elektrod. (35)



Obrázek 3 Schéma hmotnostního spektrometru na principu MALDI-TOF (36)

Získá se tak řada hodnot molekulových hmotností, které se zadají do veřejně přístupné databáze (Swiss-Prot, NCBIInr). Automaticky se pak databáze prohledává a hledají se peptidové štěpy, které mají stejnou hmotnost jako zadané hodnoty. Pokud je primární struktura studovaného proteinu v databázi zadána (jsou tam dnes již tisíce proteinů), podaří se ji obvykle se značnou jistotou identifikovat.

6 Cíle práce

Analýza proteinů metodou dvourozměrné elektroforézy, zvláště pak je-li následována MALDI-TOF MS, přináší jasný obraz proteinů zastoupených ve vzorku. Předmětem této studie bylo sledování změn proteinů u nemocí ledvin spojených s nefrotickým syndromem a jinými glomerulopatiemi pomocí moderních analytických technik; izoelektrické fokusace, dvourozměrné elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a MALDI-TOF MS. Hlavním cílem práce bylo navrhnout 2D metodiku, která by poskytovala přehledná spektra proteinů v moči nefrotických pacientů a poukazovala na případné proteinové změny způsobené nejen přítomností proteáz, ale také vlivem daného onemocnění či léčbou.

1. Zavedení metody pro stanovení přehledných spekter proteinů v moči nefrotických pacientů

- optimalizace techniky dvourozměrné elektroforézy na vzorky moče nefrotických pacientů.
- vliv odstranění albuminu ze vzorku
- stabilitní studie vzorků moči
- sledování proteinových změn v důsledku přítomnosti proteáz

2. Studie proteinů v moči u pacientů s nefrotickou proteinurií

- porovnávání 2D spekter proteinů mezi jednotlivými skupinami
- charakterizace vybraných proteinů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrofotometrie

3. Studie močových proteomů u pacientů s Andersonovo-Fabryho chorobou

- zjištění rozdílů v proteomu mezi pacienty s Andersonovo-Fabryho chorobou a zdravými jedinci
- identifikace potenciálních specifických proteinů nemoci pomocí MALDI-TOF MS

7 Materiál a metodika

Nalezení specifického biomarkeru v moči nefrotických pacientů, který by charakterizoval dané onemocnění ledvin, by bylo velkým přínosem zejména pro pacienty, jenž by nemuseli být podrobováni nepříjemným a invazivním vyšetřením. Pomocí 2D techniky lze získat přehled o zastoupení a rozmístění všech proteinů obsažených v moči a k nalezení rozdílů, které se mezi jednotlivými diagnózami vyskytují.

7.1 Sledované skupiny pacientů

Sledovanou skupinu tvořilo 60 pacientů s nefrotickou proteinurií a jinými diagnózami (ANCA-asociovaná vaskulitida (AAV), systémový lupus erytematodes s postižením ledvin (lupusová nefritida), amyloidóza AL, membranózní nefropatie, IgA nefropatie, primární fokální segmentální glomeruloskleróza (FSGS), Wegenerova granulomatóza (45 mužů, 15 žen, ve věku (18-78 let). Jejich proteinurie se pohybovala v rozmezí 0,23 – 19g za 24h (Tabulka I.). Další skupinou bylo 20 pacientů s Andersonovo-Fabryho chorobou (11 mužů, 9 žen, ve věku 18-69 let). Jejich proteinurie se pohybovala v rozmezí mezi 0,1 – 1 g za 24h, 13 pacientů bylo podrobena enzym-substituční léčbě (devíti z nich byla podána agalsidasa beta, Fabrazyme® 1 mg/kg každý druhý týden; čtyřem agalsidasa alfa, Replagal® 0,2 mg/kg každý druhý týden) a sedm bylo neléčených (Tabulka II.). Fyziologická proteinurie se obvykle pohybuje v rozmezí mezi 30-50 mg/den a je převážně složena z tubulárních proteinů, jmenovitě uromodulin (Tamm-Horsfall protein). Hodnota proteinurie 150 mg/den může být považována jako horní limit „normální“ proteinurie. Kontrolní skupina se skládá z 10 zdravých jedinců (5 mužů a 5 žen ve věku 27- 42 let). (Tabulka I.)

Tabulka I. Klinická data pacientů s nefropatií a zdravých jedinců
 Ž ženy, M muži

Číslo pacienta	věk	pohlaví	proteinurie (g/l)	S_kreatinin (μmol/l)	U_kreatinin (mmol/l)	Diagnóza
1	41	M	18,7	153	30,4	IgA nefropatie
2	71	M	1,89	144	19,5	Amyloidóza AL
3	62	Ž	6,07	111	3,8	Amyloidóza AL
4	78	M	3,6	80	12,2	Amyloidóza AL
5	58	M	0,72	120	4,1	Wegenerova granulomatóza
6	56	M	1,71	412	4,8	Wegenerova granulomatóza
7	36	Ž	0,25	46	5,6	Lupusová nefritida
8	62	M	2,8	140	8,3	Membranózní nefropatie
9	32	M	1,4	220	7,1	Lupusová nefritida
10	57	M	1,54	307	4,1	Wegenerova granulomatóza
11	21	M	0,58	60	16,1	Membranózní nefropatie
12	57	M	4,31	491	7,8	Wegenerova granulomatóza
13	58	M	1,68	153	7,7	Membranózní nefropatie
14	21	M	4,04	49	15,2	Membranózní nefropatie
15	39	Ž	1,77	60	5,4	Lupusová nefritida
16	49	Ž	1,69	54	5,3	IgA nefropatie
17	61	M	1,27	75	8,6	Nefrotický syndrom- FSGS
18	62	M	0,23	235	6,3	Wegenerova granulomatóza
19	31	Ž	0,37	55	16,7	Wegenerova granulomatóza
20	34	M	1,8	217	4,2	Wegenerova granulomatóza
21	24	M	1,19	210	8,2	Wegenerova granulomatóza- p. ANCA
22	19	Ž	1,7	166	7	IgA nefropatie
23	66	M	1,17	241	6,6	Membranózní nefropatie
24	35	M	3,79	120	9,4	IgA nefropatie
25	65	Ž	2,21	330	4,3	Nefrotický syndrom
26	65	M	0,96	460	5	IgA nefropatie
27	48	M	0,35	400	4,5	Wegenerova granulomatóza
28	55	M	1,03	280	2,7	Wegenerova granulomatóza
29	21	M	6,9	138	9,1	Nefrotický syndrom – FSGS
30	52	M	1,15	89	12,8	Membranózní nefropatie
31	50	M	7,25	95	20,5	Membranózní nefropatie
32	29	Ž	0,99	77	7,2	Lupusová nefritida
33	42	M	1,83	95	10,3	Membranózní nefropatie
34	44	M	7,33	400	8,3	Membranózní nefropatie
35	31	M	1,17	65	3,7	Lupusová nefritida
36	57	M	5,72	120	11,9	Membranózní nefropatie
37	39	Ž	12,12	63	9,6	Membranózní nefropatie
38	21	M	15,71	130	25,9	Nefrotický syndrom
39	67	M	1,48	370	3,5	IgA nefropatie
40	65	M	2,39	393	7,9	IgA nefropatie
41	62	M	9,28	380	8,5	Nefrotický syndrom
42	60	M	14,91	310	17,9	Nefrotický syndrom
43	37	Ž	1,41	109	17,3	Lupusová nefritida

44	61	M	4,6	153	8,4	Nefrotický syndrom – FSGS
45	70	M	1,64	180	7,5	IgA nefropatie
46	70	M	6,48	100	12	Amyloidóza AL
47	61	M	4,69	92	6	Wegenerova granulomatóza
48	44	M	1,9	85	4,5	Membranózní nefropatie
49	62	Ž	3,31	110	4,5	Nefrotický syndrom – FSGS
50	69	Ž	1,36	150	2,5	Amyloidóza AL
51	73	M	7,52	320	4,3	Nefrotický syndrom – FSGS
52	18	Ž	7,31	380	5,1	Lupusová nefritida
53	63	M	2,51	95	6,7	Amyloidóza AL
54	57	M	5,72	164	8,1	Nefrotický syndrom
55	37	Ž	3,5	113	5,2	IgA nefropatie
56	27	M	1,2	135	2,5	IgA nefropatie
57	45	M	4,8	213	3,7	Nefrotický syndrom
58	63	Ž	5,3	240	4,8	Nefrotický syndrom
59	55	M	1,23	154	2,1	Amyloidóza AL
60	32	M	2,4	96	7,1	Wegenerova granulomatóza
1	27	M	<0,07	92	7,2	Zdráv
2	28	Ž	<0,07	85	7,5	Zdráv
3	45	M	<0,07	65	8,9	Zdráv
4	37	M	<0,07	74	8,1	Zdráv
5	42	M	<0,07	72	9,6	Zdráv
6	30	Ž	<0,07	80	11,3	Zdráv
7	31	Ž	<0,07	83	10,9	Zdráv
8	39	Ž	<0,07	95	7,8	Zdráv
9	40	Ž	<0,07	63	12,4	Zdráv
10	29	M	<0,07	82	13,1	Zdráv

7.2 Příprava vzorků moče

Jedním z cílů naší práce bylo optimalizovat techniku dvourozměrné elektroforézy na vzorky moče pacientů s nefropatií tak, abychom získali přehledná a reprodukovatelná 2D spektra proteinů v moči. K dosažení toho úkolu, jsme se v první fázi našeho studia zaměřili na podrobnou úpravu vzorků a stanovení vhodných podmínek 2D analýzy.

7.2.1 Koncentrování a skladování vzorků moče

K analýze bylo použito 30 ml moče sbírané po dobu 24h. Koncentrace celkové bílkoviny u všech analyzovaných vzorků byla stanovena metodou s pyrogalovou červení (37, 38). Principem je reakce proteinů ve vzorku s pyrogalovou červení a molybdenanem sodným

v kyselém prostředí za vzniku barevného komplexu detekovatelného spektrofotometricky. Moč po sběru (1057 ml/ 24h) byla 10x ředěna roztokem obsahujícím 60 $\mu\text{l/l}$ pyrogalové červeně, 40 $\mu\text{mol/l}$ molybdenanu sodného a 50 nmol/l sukcinátu, $\text{pH} = 2,3$. Po 10 minutové inkubaci při 37 °C byla měřena absorbance při vlnové délce 600 nm na přístroji Modular (Spektrofotometr Modular, Roche, Švédsko). Vzorky, zejména u pacientů s AFD, jejichž koncentrace proteinů v moči nepřesahovala 1g/l byly zahuštěny centrifugací pomocí Amicon Ultra 10 kDa (Millipore, Massachusetts), po dobu pěti minut při 3000 x g a 4 °C (39). Ke stanovení koncentrace proteinů pro centrifugaci byla využita spektrofotometrická metoda podle Bradfordové (40). Pro kalibraci byl použit roztok hovězího sérového albuminu (BSA). Barevný komplex vznikl reakcí bílkovin s činidlem obsahujícím 0,1 mM roztok Commassie brilliant blue G250; 5% (95% ethanol); 10% (85% H_3PO_4). Analyzované vzorky byly připraveny smícháním 200 μl vzorku a 2,5 ml roztoku činidla dle Bradfordové, inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě (25°C) a absorbance byla sledována při vlnové délce 595 nm proti standardu. Vzorky byly poté ihned analyzovány nebo uchovávány v malých alikvotách při -80 °C.

7.3 Stanovení proteinů v moči pomocí 2D elektroforézy

K separaci proteinů v moči metodou dvourozměrné elektroforézy jsme využili přístroj Multiphor II (Amersham Biosciences, Švédsko) se zdrojem Power Supply EPS 3501 (Amersham Biosciences, Švédsko).

Vzorky byly děleny na základě svých izoelektrických bodů metodou izoelektrické fokusace (IEF) s využitím komerčně připravených 7 cm polyakrylamidových stripů s imobilizovaným lineárním gradientem pH 3-10 (IPG strip pH 3-10L, Amersham Biosciences) (34), kdy celkové množství proteinů nanášené na polyakrylamidový strip bylo 20 μg .

Tabulka II. Klinická data pacientů s Andersonovo-Fabryho chorobou

DM diabetes melitus, ERT enzym-substituční léčba, HD hemodialýza, ACE inhibitory enzymu konvertujícího angiotenzin, AT blokátor receptoru angiotenzinu, A ano, N ne, Ž ženy, M muži.

Číslo pacienta	věk	pohlaví	Mutace GAL, genotyp	Mainz skóre	Alfa-agal leukocyty (nmol/mg.h)	ERT	Terapie od	Léky	DM	ACE inhib., AT blok.	S _{kre} kreatinin (μmol/l)	U _{kre} kreatinin (mmol/l)	HD	Transplantace	proteinurie (g/l)
1	57	Ž	N215S	19	30,3	N			N	A	53	11,5	N	N	< 0,07
2	60	Ž	N215S	20	27,8	N			N	N	76	8,40	N	N	< 0,07
3	69	Ž	c.674del59	27	23,6	A	12/2001	Fabrazyme	N	A	77	11,10	N	N	0,14
4	39	Ž	R342Q	14	28,6	N			N	N	78	1,6	N	N	< 0,07
5	60	Ž	R342Q	15	8,5	A	11/2004	Replagal	N	A	85	18,3	N	N	0,17
6	46	Ž	delEx2	19	25,4	N			N	N	78	13,7	N	N	< 0,07
7	55	Ž	R342Q	7	17,9	A	12/204	Replagal	N	A	57	18,6	N	N	0,13
8	64	Ž	I317T	38	22,3	N			N	A	73	6,8	N	N	0,08
9	61	Ž	R342Q	54	21	N			A	A	93	4,3	N	N	0,09
10	40	M	c.674del59	38	0,7	A	12/2004	Replagal	N	N	75	5,6	N	N (nefrektomie 2006)	0,18
11	32	M	c.674del59	14	0,7	A	12/2003	Replagal	N	N	67	6,9	N	N	0,08
12	43	M	c.674del59	31	0,3	A	12/2003	Fabrazyme	N	N	82	9,5	N	N	0,1
13	42	M	delEx2	22	2,5	A	1/2004	Fabrazyme	N	N	73	10,5	N	N	0,14
14	40	M	R342Q	25	1,6	A	2/2004	Fabrazyme	N	N	75	7,7	N	N	0,08
15	18	M	c.674del59	16	0,2	N	2007	Fabrazyme	N	N	69	3,3	N	N	< 0,07
16	52	M	delEx2	34	0,22	A	1/2004	Fabrazyme	N	A	71	9,5	N	N	0,24
17	59	M	c.674del59	51	2,6	A	7/2001	Fabrazyme	N	N	185	2,4	N	N	0,37
18	55	M	L294X	32	0,4	A	11/2004	Fabrazyme	N	A	645	6,3	A	A (1984, HD začátek od 2005)	0,61
19	51	M	R342Q	47	1,0	A	11/2004	Fabrazyme	N	A	218	6,1	A	A (HD začátek v 2001, další transpl. 2006)	0,38
20	48	M	c.674del59	34	1,82	A	2/2004	Fabrazyme	N	A	122	6,2	N	N	0,66

Před analýzou byl strip přes noc rehydratován rehydratačním roztokem (12 g močoviny; 0,5 g triton X-100; několik kapek Bromphenol blue; 25 ml H₂O: aliqvoty, po 2,5ml zamrazit na -20 °C; před použitím přidat IPGbuffer (50 µl), 7 mg DTT) obsahujícím vzorek. Samotná izoelektrická fokusace probíhala ve třech krocích s postupně se zvyšující hodnotou napětí až na konečných 3500 V. Po IEF byl strip zamražen na -80 °C nebo ihned ekvilibrován pomocí ekvilibračního roztoku (6,7 ml 1,5 M Tris-Cl, pH=6,8; 72,07 g močoviny; 69 ml glycerolu, 4 g SDS, několik kapek Bromfenol Blue, do 200 ml destilované H₂O; před použitím přidat ještě 2 g DTT). Takto rozdělené proteiny byly následně separovány SDS-elektroforézou v 12% homogenním polyakrylamidovém gelu podle molekulové hmotnosti s využitím SE260 Mini-vertikální elektroforézy (Scie-Plas, Velká Británie) a mini vertikální elektroforézy (Hoefler, CA). Vizualizace rozdělených proteinů byla prováděna stříbrem (Silver Bullit Kit, Amresco) (41).

K analýze proteinů 2D gelů byl využit software Phoretix 2D expression verze 2005. Referenčním gelem byl zvolen gel vzorku moče pacienta, jenž byl analyzován ihned po sběru. Tento gel byl dále použit pro porovnání příslušných proteinů mezi gely vzorků s přídavkem a bez přídavku inhibitorů proteas. Proteiny ve všech gelech byly spárovány automaticky, potvrzeny a upraveny manuálně. Pozadí bylo odečteno a intenzita objemu každé spoty byla normalizována vzhledem k celkové intenzitě objemu všech rozpoznávaných spot, dále označeno jako normalizovaná kvantita proteinu. Procenta zastoupení daného proteinu ve vzorcích byla počítána dle námi nastavené rovnice:

% proteinu: [množství proteinu ve vzorku (s přídavkem či bez přídavku inhibitoru) / množství proteinu ve vzorku analyzovaném ihned po sběru] x 100

7.4 Aplikace optimalizované techniky

Vedle stanovení vhodných podmínek 2D metodiky jsme se dále zaměřili na faktory,

kteře by mohly skladbu proteinů v moči nepříznivě ovlivnit. Zajímala nás zejména stabilita vzorku při uskladnění a přítomnost vyšších koncentrací albuminu ve vzorcích. Dále také zjištění přítomnosti a vlivu proteáz při fyziologické teplotě 37°C.

7.4.1 Ověření stability vzorků

Stabilita vzorků při -80 °C, jenž nebyly rozděleny ihned po sběru, byla ověřena opakovanou analýzou vzorků po 30 a 180 dnech uskladnění. Takto bylo studováno 5 různých vzorků pacientů s nefrotickým syndromem. Sledovaní pacienti jsou charakterizováni v Tabulce I. pod čísly 17, 29, 38, 41 a 58. Spektra proteinů vzorků analyzovaných ihned po sběru, po 30 a 180 dnech uskladnění při -80 °C byla porovnávána pomocí softwaru Phoretix 2D expression verze 2005.

7.4.2 Separace albuminu ze vzorků

Albumin byl ve vzorcích moče stanovován nefelometricky pomocí imunochemického systému IMMAGE. Metoda je založena na měření rychlosti nárůstu vzniku imunokomplexů během reakce albumin-protilátka. 21μl vzorku moče je smícháno s komerčně připravenou směsí protilátky (upravené kozí sérum) a pufru do celkového objemu 321μl.

K odstranění albuminu u vzorků, kde koncentrace albuminu byla vyšší než 3 g/ 24h byla využita metoda srážení síranem amonným (42). K danému objemu každého z pěti sledovaných vzorků s nefropatií a proteinurií 5g/ 24h bylo přidáno takové množství síranu amonného, aby došlo k 50% nasycení směsi a společně inkubováno při 4 °C za stálého míchání 16h. Byli studováni pacienti označení v Tabulce I. pod čísly 3, 36, 44, 54, 58. Právě při 50% sycení vzorku síranem amonným, dochází k vysrážení proteinů a v roztoku zůstává pouze albumin, který disponuje vyšší rozpustností. Poté byla směs centrifugována (Amicon Ultra 10 kDa, 10 minut, 10 000 x g, 4 °C). Peleta obsahující všechny bílkoviny kromě albuminu byla rozpuštěna destilovanou vodou a převedena do dialyzačního střeva (dialyzační

membrána 10 kDa Visking, Německo). Postupnou dialýzou proti 1,5M Tris pufru o pH=7,5 byl odstraněn síran amonný, který by rušil následná stanovení proteinů. Celková koncentrace bílkovin po odstranění albuminu byla měřena metodou dle Bradfordové. Takto připravené vzorky byly ihned analyzovány 2D elektroforézou.

7.4.3 Vliv proteáz

Přítomnost proteáz ve vzorcích moči byla sledována u pěti pacientů s primární glomerulopatií po 48 hodinové inkubaci v termostatu při fyziologické teplotě 37 °C. Jednalo se o dva pacienty s nefrotickým syndromem charakterizované v Tabulce I. pod čísly 25, 57 a tři pacienty s Wegenerovou granulomatosou označených v Tabulce I. čísly 10, 12 a 28. Z každého vzorku moči byly ihned po sběru odebrány tři stejné alikvoty o obsahu 5 ml. K jedné z nich bylo přidáno 40 µl koktejlu inhibitorů proteáz (Protease inhibitor cocktail - serinových, cysteinových, aminopeptidas; Sigma, MO) a azid sodný. K druhým 5 ml stejného vzorku byl přidán pouze azid sodný. Oba alikvoty vzorku byly inkubovány 48h při 37°C. Třetí alikvota byla bez přídavku azidu sodného či inhibitoru proteáz zamražena při -80 °C ihned po sběru. Všechny alikvoty byly analyzovány společně ve stejnou dobu.

7.5 Enzymatické štěpení proteinů v gelu

K analýze MALDI-TOF MS byly vybrány abundatní proteiny, které byly zastoupeny pravidelně na všech sledovaných gelech, dále proteiny, jejichž exprese byla výrazně zvýšena či proteiny jejichž výskyt se lišil v porovnání s referenčními gely.

Proteiny detekované stříbrem byly z 2D gelů vyříznuty, nařezány na malé kousky a několikrát promývány čerstvým 30mM roztokem kyanoželezitanu draselného a 100mM roztokem thiosíranu sodného v koncentraci 1:1. Po kompletním odbarvení byly kousky gelu omyty vodou, dehydratovány roztokem ACN a znovu rehydratovány vodou. Supernatant byl odstraněn a gel byl částečně vysušen vakuovým koncentrátorem. Gelové štěpy byly následně

reorganizovány štěpícím pufrem obsahujícím 0,01% 2-merkptoethanol, 0,1M – ethylmorfolin acetát, 1mM CaCl₂, 10% ACN a na sekvenční úrovni modifikovaný trypsin (50 ng/ml, Promega). Vzorek byl štěpen přes noc a získané peptidy byly extrahovány 40% ACN/ 0.5% TFA. Abychom získali i nízkomolekulární proteiny, byly peptidy před samotnou MS analýzou čištěny a koncentrovány s využitím ZipTip špiček s 0.6 µl pryskyřice (s delším řetězcem (C18) a póry cca 20 nm pro sorpci a eluci peptidů). ZipTip™ (Millipore, MA) jsou polypropylenové špičky o objemu 10 µl částečně naplněné chromatografickým médiem sloužící k purifikaci a/nebo zakoncentrování peptidů, proteinů nebo oligonukleotidů pro hmotnostní spektrometrii. Médium je umístěno na samém konci špičky, čímž je zajištěn nulový mrtvý objem.

7.6 MALDI-TOF MS a identifikace proteinů

10 mg/ml roztoku CHCA (Bruker Daltonik, Německo) v 30% ACN / 30% MeOH roztoku obsahujícího 0.2% TFA bylo použito jako MALDI matrice. 1 ml vzorku byl nanesen na ocelovou MALDI destičku a ponechán na vzduchu při pokojové teplotě vyschnout. Poté byl přidán 1 ml roztoku matrice. Hmotnostní spektra kladně nabitých iontů byla získána použitím MALDI-TOF/TOF hmotnostního spektrofotometru (Autoflex II, Bruker Daltonik, Německo) v refletronovém módu vybaveném dusíkovým laserem o vlnové délce 336 nm. Získaná spektra byla v rozmezí molekulových hmotností 700–4500 Da. Data byla kalibrována proti Peptidovému kalibračnímu standardu I (Bruker Daltonik, Německo) jako externímu kalibračnímu standartu s využitím sedmi bodové kalibrace. K sekvenování vybraných peptidů byla použita analýza vzorků pomocí ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI) v kombinaci s detektorem doby letu (MS/MS) pracujících v MS/MS módu (MALDI LIFT TOF/TOF MS). S využitím flexAnalysis 2.4 programu se SNAP algoritmem detekce píků, byl vytvořen peak list ve formátu XML. Statistická kalibrace byla součástí programu, a proto nebyly nutné žádné další úpravy; maximální číslo označených píků bylo

stanoveno na 50. Všechny kontaminující signály byly po označení píků odstraněny. Peak list byl zkoumán pomocí Swiss-Prot nebo NCBI nr databází v souboru lidských proteinů s využitím MASCOT vyhledávače podle zadaných kritérií: tolerance peptidů 100ppm, počet chybných štěpných míst nastaven na 1, modifikace cysteinu karbamidometylací a různá oxidace methioninu. Žádná omezující kriteria týkající se molekulové hmotnosti (MW) a hodnoty izoelektrického bodu (pI) nebyla nastavena. Identita jednotlivých proteinů byla potvrzena pomocí MS/MS peptidového sekvenování, když pravděpodobnost založená na Mowse skóre byla pouze lehce vyšší než prahová hodnota vypočtená pro použité parametry nebo pokud bylo sekvenční pokrytí příliš nízké.(35)

7.7 Statistická analýza

Statistická analýza byla získána s použitím programu Statistica CZ 9 (StatSoft, Praha 6, Česká republika). Všechny hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm standardní odchylka nebo v procentech. Data byla zpracována analýzou ANOVA při opakovaných měřeních a hladiny významnosti pro Tukey test (honest significant difference HSD) byly hodnoceny v post-hoc analýze jako statisticky významné na hladině $p < 0.05$.

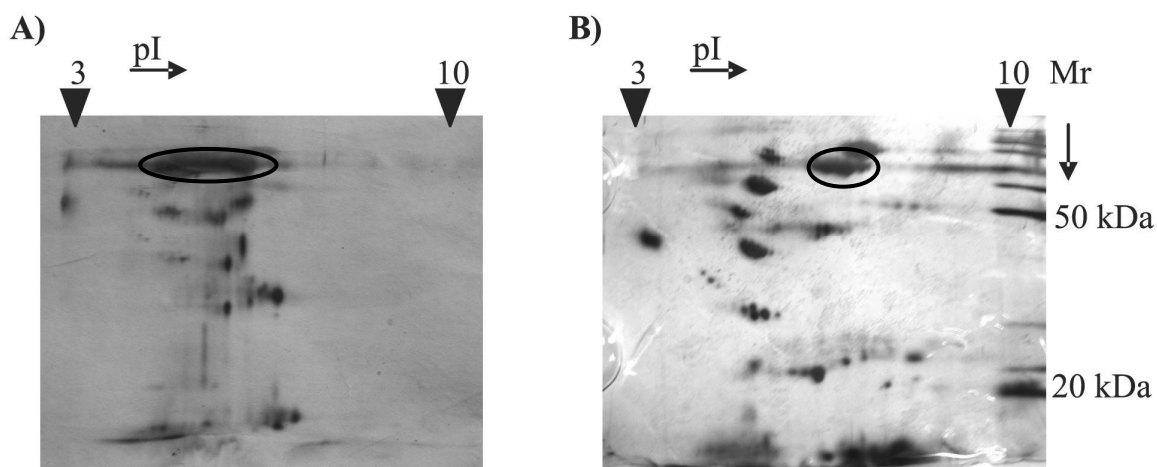
8 Výsledky

8.1 Zavedení 2D metodiky

Byla zavedena a optimalizována technika 2D elektroforézy tak, abychom získali přehledná spektra proteinů v moči u pacientů s onemocněním ledvin. Zaměřili jsme se především na přípravu vzorku moči a samotnou analýzu tak, aby nedocházelo ke ztrátám či ovlivnění množství proteinů v průběhu stanovení.

8.1.1 Separace albuminu ze vzorku

Albumin, který ve vzorcích s vyšší proteinurií (zejména nad 5g/ 24h) zhoršoval přehlednost proteinových map, byl odstraněn metodou využívající různé rozpustnosti proteinů při dané koncentraci solí (kapitola 7.4.2). Koncentrace albuminu se v těchto vzorcích pohybovala kolem 3g/ 24h. Na Obr. 4 jsou znázorněny proteinové mapy před a po separaci albuminu u pacienta s proteinurií.



Obrázek 4. Porovnání spekter proteinů před a po odstranění albuminu.

Vzorky moče byly ihned po sběru analyzovány pomocí 7 cm polyakrylamidových stripů pH 3-10L metodou IEF, kdy celkové množství proteinů nanesených na strip bylo 20 μ g. V druhém směru byly děleny SDS-PAGE v 12% polyakrylamidovém gelu a detekovány stříbrem. Spektrum proteinů u pacienta s nefrotickým syndromem před A) a po B) odstranění albuminu. Černě je označen albumin.

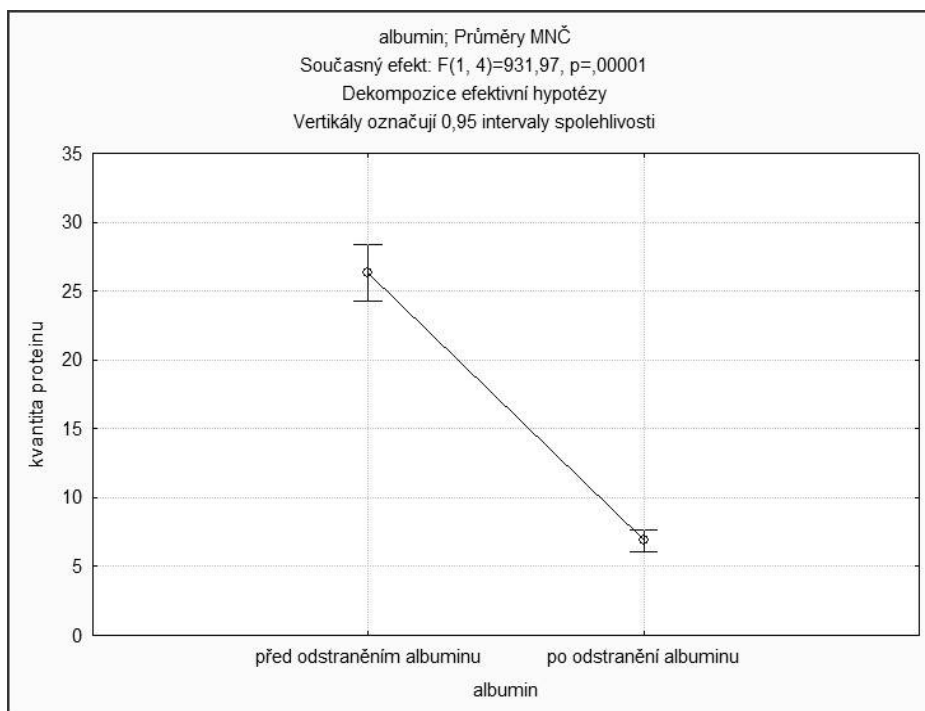
Odstraněním albuminu došlo u vzorků ke zvýšení přehlednosti celého spektra a k výraznějšímu rozlišení proteinů zejména v oblasti > 30 kDa. Hodnocením 2D elektroforeogramů s využitím softwaru 2D expression verze 2005 jsme získali normalizované hodnoty (intenzity) kvantity albuminu před a po separaci albuminu a zaznamenali 75% pokles této hodnoty (Tab. III).

Tabulka III. Albumin se signifikantní změnou intenzity kvantity před a po separaci ze vzorku.

Normalizovaná hodnota kvantity (průměr ± SD) ^a			
	albumin před extrakcí	albumin po extrakci	p- hodnota
albumin	26,53 ± 1,66*	6,63 ± 0, 63*	0, 000292*

^a) N=5 elektroforeogramů získaných z pěti nezávislých alikvotů moče. * Hodnoty byly analyzovány ANOVA testem na hladině významnosti $p < 0, 05$ a porovnávány Tukey HSD testem.

ANOVA test při opakovaných měřeních a následná post-hoc (Tukey test) analýza na hladině významnosti $p < 0,05$ byla statisticky významná pro rozdíly mezi kvantitou albuminu u vzorků před a po odstranění albuminu. Jak je vidět z obrázku 5, kvantita albuminu je ve vzorcích před extrakcí albuminu signifikantně vyšší, než po jeho separaci.



Obrázek 5. Normalizovaná kvantita albuminu před a po separaci albuminu ze vzorku

Také jednorozměrná elektroforéza tří frakcí obsahujících proteiny před extrakcí albuminu, supernatant po centrifugaci a močové proteiny po extrakci albuminu, ukázala efektivnost této metodiky, kdy po centrifugaci zůstal v supernatantu pouze albumin bez přítomnosti dalších proteinů. (Obr. 6).

Obrázek 6. SDS-PAGE elektroforéza v 12% polyakrylamidovém gelu, detekce stříbrem.

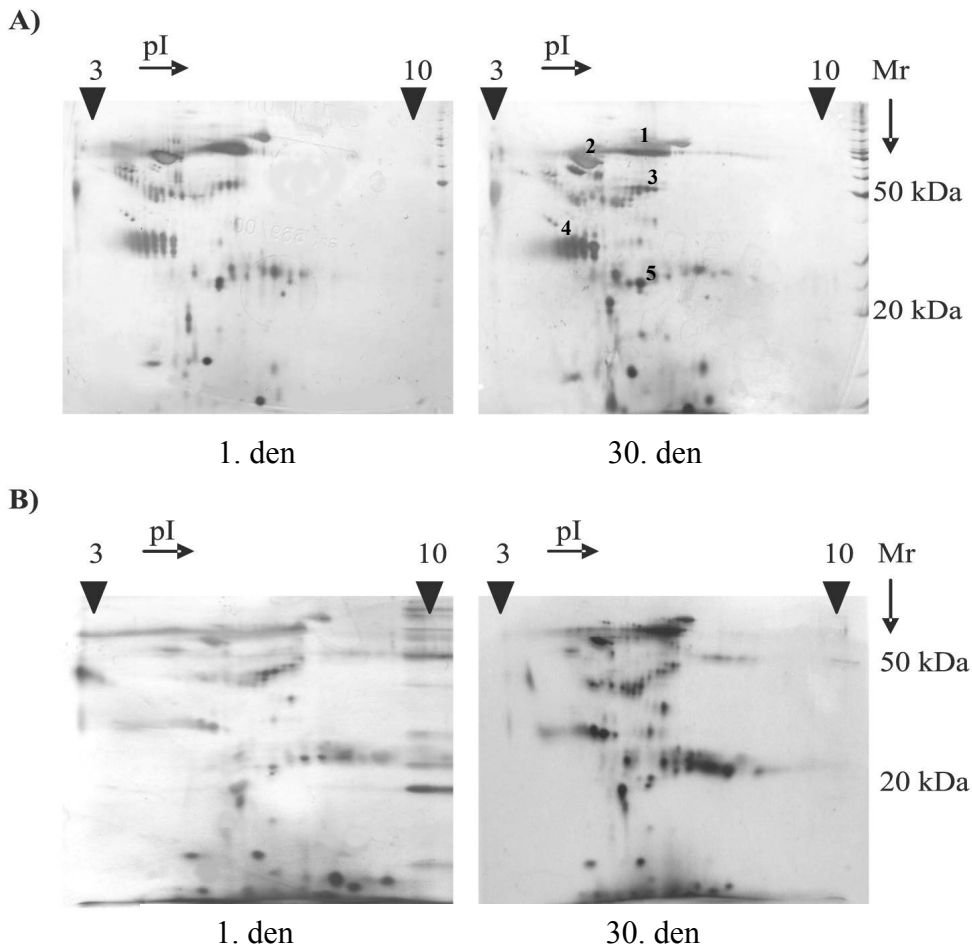


1. 2. 3. 4.

1. standard
2. močové proteiny před extrakcí albuminu
3. supernatant po centrifugaci obsahující albumin
4. močové proteiny po extrakci albuminu

8.1.2 Ověření stability vzorků

Množství proteinů v moči u nefrotického syndromu jsou při proteinurii zpravidla vyšší než 1 g/ 24h. Pro detekci proteinů stříbrem, nebylo proto nutné takové vzorky pro následnou 2D analýzu dále koncentrovat. Na Obr. 7 jsou ukázány dva různé vzorky moče pacientů s nefrotickým syndromem analyzované první a třicátý den po sběru vzorku. Studium spekter proteinů pomocí softwaru Phoretix 2D expression verze 2005 před a po 30-ti denním uskladnění neprokázalo změny v zastoupení a obsahu proteinů ve vzorcích. Stejně výsledky byly získány také opakovanou analýzou vzorku po 6 měsících. V tabulce IV. jsou uvedeny normalizované kvantita (intenzita kvantita) pěti vybraných proteinů. Tyto proteiny jsou také označeny na obrázku 7.



Obrázek 7. Porovnání spekter proteinů analyzovaných v různém časovém intervalu po sběru vzorku. Vzorky moče byly analyzovány pomocí 7 cm polyakrylamidových stripů pH 3-10L metodou IEF. Celkové množství proteinů nanesených na strip bylo 20 μ g. Dále byly děleny SDS-PAGE v 12% polyakrylamidovém gelu a detekovány stříbrem.

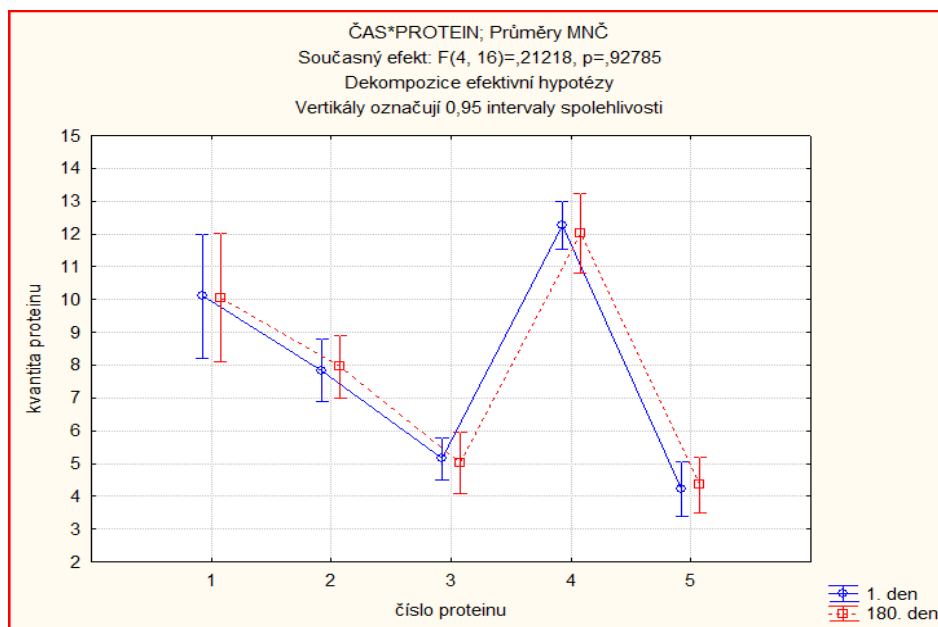
ANOVA analýza při opakovaných měřeních na hladině významnosti $p < 0,05$ byla statisticky nevýznamná pro rozdíly mezi kvantitou sledovaných proteinů u vzorků analyzovaných první den po sběru a 180. den po sběru skladovaných při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Obr. 8).

Tabulka IV. Hodnoty proteinů 1. a 180. den po sběru moče

Analyzovaná data (intenzita kvantity proteinů) pomocí Phoretix 2D expression v2005 (průměr \pm SD) ^a			
číslo proteinu	1. den po sběru	180. den po sběru	p-hodnota
protein 1	10,11 \pm 1,51*	10,06 \pm 1,57*	1,000000*
protein 2	7,84 \pm 0,76*	7,95 \pm 0,77*	0,999998*
protein 3	5,14 \pm 0,52*	5,01 \pm 0,75*	0,999995*
protein 4	12,27 \pm 0,59*	12,02 \pm 0,97*	0,999202*
protein 5	4,22 \pm 0,66*	4,35 \pm 0,68*	0,999994*

^a) N=5 elektroforeogramů získaných z pěti nezávislých alikvotů moče. * Hodnoty byly analyzovány ANOVA testem na hladině významnosti $p < 0,05$ a porovnávány Tukey HSD testem.

Pro stanovení statistické významnosti rozdílů mezi totožnými proteiny v obou časových intervalech byl aplikován Tukey test, kde také nebyla zjištěna statistická významnost ($p < 0,05$) v rozdílech mezi sledovanými proteiny vlivem skladování (Tab. IV).

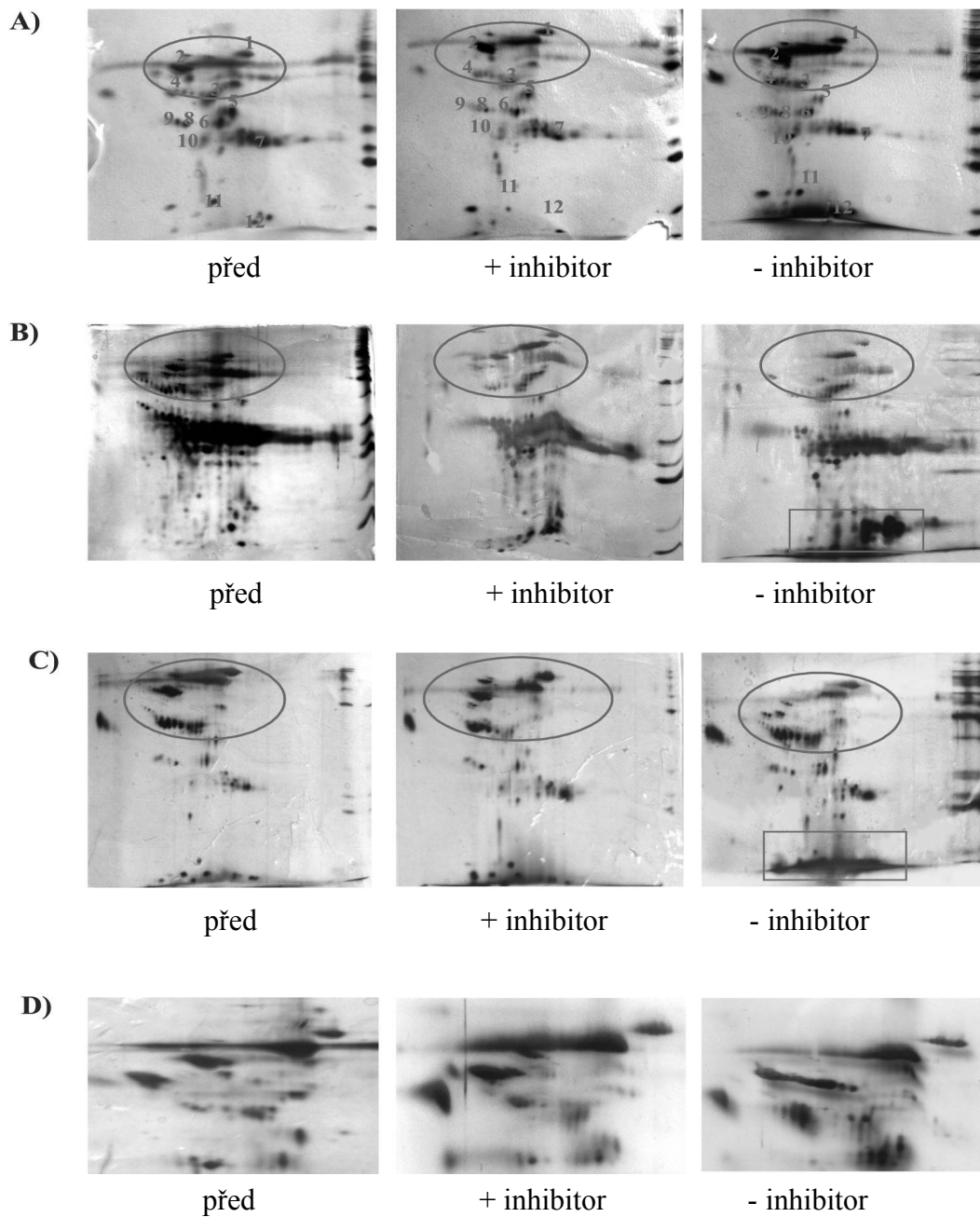


Obrázek 8. Porovnání normalizované kvantity vybraných proteinů 1. den po sběru a 180. den po uskladnění

8.1.3 Vliv proteáz

Při onemocnění ledvin je zpravidla množství enzymů (včetně proteáz) v moči vlivem porušené filtrace krevní plazmy zvýšeno a mohlo by nepříznivě ovlivňovat výsledky analýzy proteinů. Na Obr. 9 jsou uvedeny příklady čtyř různých vzorků moči pacientů s nefrotickým syndromem, kdy první tři (A, B, C) se zaměřují na porovnání celého spektra proteinů a poslední z nich (D) na oblast o vyšší molekulové hmotnosti, než 30 kDa.

Sledováním spekter proteinů pomocí softwaru Phoretix 2D expression verze 2005 bylo u všech pěti různých vzorků s primární glomerulopatií potvrzeno, že k výraznějším změnám kvantity proteinů dochází zejména ve dvou oblastech s molekulovou hmotností 50 – 100 kDa a 10 – 20 kDa (Obr. 9 - vyznačené černé obrazce).



Obrázek 9. Změny spekter proteinů v závislosti na přítomnosti inhibitorů proteáz u čtyř různých pacientů (A, B, C, D) s nefrotickým syndromem. D) detailní porovnání změn spektra proteinů v oblasti molekulové hmotnosti vyšší jak 30 kDa. Vzorky byly analyzovány po předchozí inkubaci (kapitola 5.4.3) metodou IEF na polyakrylamidových stripech, kdy celkové množství proteinů nanesených na strip bylo 20 μ g. V druhém směru byly vzorky děleny SDS-PAGE v 12% polyakrylamidovém gelu a detekovány stříbrem.

Data intenzity kvantity proteinů hodnocených pomocí softwaru 2D expression verze 2005 jsou shrnuta v tabulce V. U vzorků dochází bez přítomnosti inhibitorů proteáz k proteolýze projevující se zvýšeným množstvím proteinů v oblasti 10 kDa a naopak úbytkem některých proteinů v oblasti molekulové hmotnosti 50 kDa.

Tabulka V. Intenzity kvantity vybraných proteinů před experimentem, s přidavkem inhibitorů proteáz (SIN) a bez přidavku inhibitorů proteáz (BIN)

Analyzovaná data (intenzita kvantity proteinů) pomocí Phoretix 2D expression v2005					
Protein	před experimentem (průměr ± SD) ^a	SIN (průměr ± SD) ^a	BIN (průměr ± SD) ^a	p-hodnota před experimentem vs. SIN	p-hodnota před experimentem vs. BIN
1	6,69 ± 0,18*	6,29 ± 0,22*	5,44 ± 0,19*	0,080900	0,000160
2	5,66 ± 0,29*	6,82 ± 0,04*	3,71 ± 0,19*	0,000160	0,000160
3	1,27 ± 0,05*	1,60 ± 0,37*	2,64 ± 0,31*	0,376714	0,000160
4	0,62 ± 0,02*	0,66 ± 0,06*	0,71 ± 0,06*	1,000000	1,000000
5	2,26 ± 0,06*	2,45 ± 0,07*	2,95 ± 0,28*	0,998383	0,000161
6	2,26 ± 0,05*	2,01 ± 0,14*	1,25 ± 0,04*	0,913737	0,000160
7	4,46 ± 0,20*	4,76 ± 0,08*	5,00 ± 0,16*	0,648513	0,001094
8	0,97 ± 0,01*	0,94 ± 0,21*	0,90 ± 0,18*	1,000000	1,000000
9	0,60 ± 0,01*	0,65 ± 0,07*	0,81 ± 0,08*	1,000000	0,987023
10	1,38 ± 0,03*	1,22 ± 0,23*	0,90 ± 0,18*	0,999732	0,005742
11	1,46 ± 0,04*	1,26 ± 0,21*	1,95 ± 0,04*	0,994046	0,005242
12	1,18 ± 0,01*	1,87 ± 0,15*	3,88 ± 0,31*	0,000161	0,000160

^{a)} N=5 elektroforeogramů získaných z pěti nezávislých alikvotů moče. * Hodnoty byly analyzovány ANOVA testem na hladině významnosti $p < 0,05$ a porovnávány Tukey HSD testem. Tučně jsou znázorněny p-hodnoty u proteinů, kde došlo ke statisticky významným změnám intenzity kvantit.

Zaměřili jsme se tedy na proteiny z těchto skupin (na Obr. 9 očíslovány) a zjistili, že v oblasti s vyšší molekulovou hmotností jak 50 kDa dochází k výraznějšímu poklesu i vzrůstu kvantity proteinů. Naproti tomu, množství proteinů v oblasti 30 – 50 kDa klesá a vzrůstá u obou experimentů (s inhibitory či bez inhibitorů) s menšími rozdíly. Obsah proteinů s nejnižší molekulovou hmotností kolem 10 kDa u vzorků pacientů bez přidavku inhibitorů výrazně narůstá až o více jak dvojnásobek (Tab. VI a Obr. 10).

Tabulka VI. Průměrné procentuální změny vybraných proteinů pěti různých pacientů získané pomocí softwaru Phoretix 2D expression verze 2005.

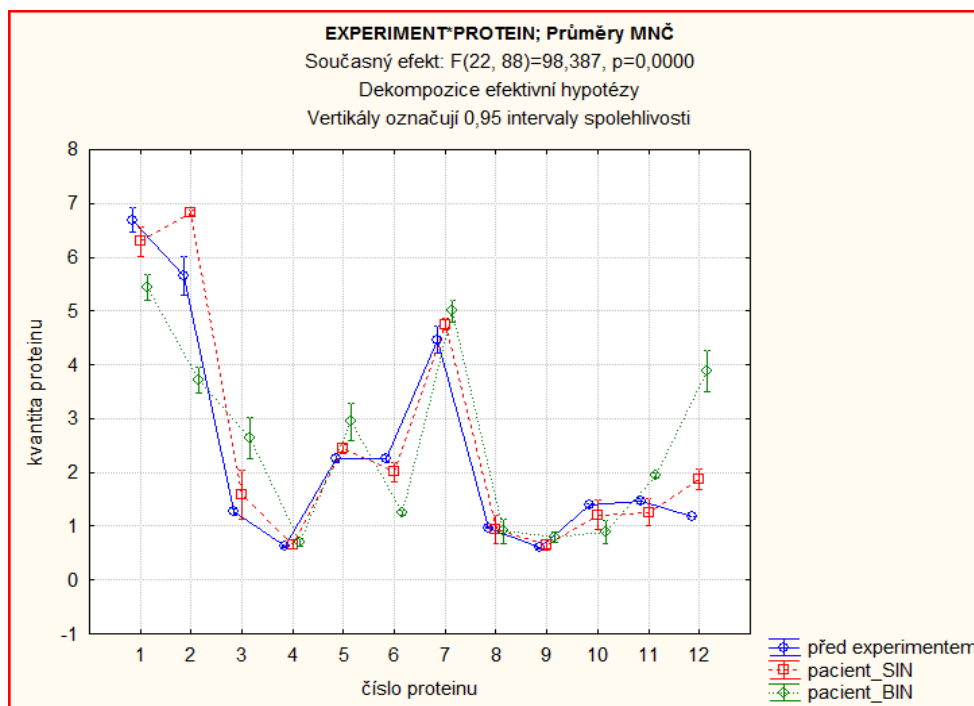
Analyzovaná data (intenzita kvantity proteinů) pomocí Phoretix 2D expression v2005					
Mol. hm. (kDa)	Protein	SIN (průměr ± SD %) ^a	BIN (průměr ± SD %) ^b	experimentální mol. w.	experimentální pI
>50	1	↓ 8 ± 1*	↓ 13 ± 1*	89	7
	2	↑ 23 ± 2*	↓ 36 ± 2*	64	5
	3	↑ 24 ± 2*	↑ 114 ± 5*	45	6,2
	4	↑ 6 ± 2*	↑ 17 ± 1*	48	5,1
>30	5	↑ 8 ± 1*	↑ 28 ± 2*	39	6,6
	6	↓ 10 ± 2*	↓ 48 ± 3*	33	6,3
	7	↑ 5 ± 1*	↑ 15 ± 2*	30	7
	8	↓ 4 ± 1*	↓ 7 ± 1*	32	5,5
	9	↑ 9 ± 2*	↑ 38 ± 3*	33	5,2
	10	↓ 13 ± 1*	↓ 30 ± 2*	27	5,6
10	11	↓ 11 ± 1*	↑ 32 ± 2*	15	5,9
	12	↑ 50 ± 2*	↑ 256 ± 16*	10	7

Tučně jsou vyznačeny hodnoty, kde došlo ke zvýšení kvantity; u nezvýrazněných hodnot došlo k poklesu kvantity. * p < 0.05 SIN vs. před experimentem; BIN vs. před experimentem

a) $n = 5: 100 - [(množství\ proteinu\ ve\ vzorku\ s\ inhibi\ torem / množství\ proteinu\ ve\ vzorku\ analyzovaném\ ihned\ po\ sběru) \times 100]$

b) $n = 5: 100 - [(množství\ proteinu\ ve\ vzorku\ bez\ inhibi\ toru / množství\ proteinu\ ve\ vzorku\ analyzovaném\ ihned\ po\ sběru) \times 100]$

Z uvedených hodnot je také patrné, že díky přidavku inhibitorů proteáz ke vzorku před inkubací při 37°C, k tak výrazným změnám proteinů v porovnání se vzorkem analyzovaným ihned po sběru v daných oblastech nedochází. 2D analýzu jsme doplnili rozborem dat s využitím ANOVA testu při opakovaných měřeních na hladině významnosti p<0,05 a následným post-hoc testováním s použitím Tukey testu (Tab. V). Potvrdili jsme, že porovnávané- li hodnoty proteinů (1-12) ve vzorku analyzovaném ihned po sběru s hodnotou proteinů ve vzorku inkubovaném s přidavkem inhibitoru proteáz, nezjišťujeme statistickou významnost v rozdílech mezi kvantitou proteinů s výjimkou proteinu 2 (>50 kDa) a 12 (10 kDa). Naopak porovnání rozdílů hodnot proteinů se vzorkem bez přidavku inhibitorů proteáz bylo hodnoceno jako statisticky významné (p<0,05) s výjimkou proteinu 4 (>50 kDa), 8 (>30 kDa) a 9 (10 kDa), které byly statisticky nevýznamné (Obr. 10).



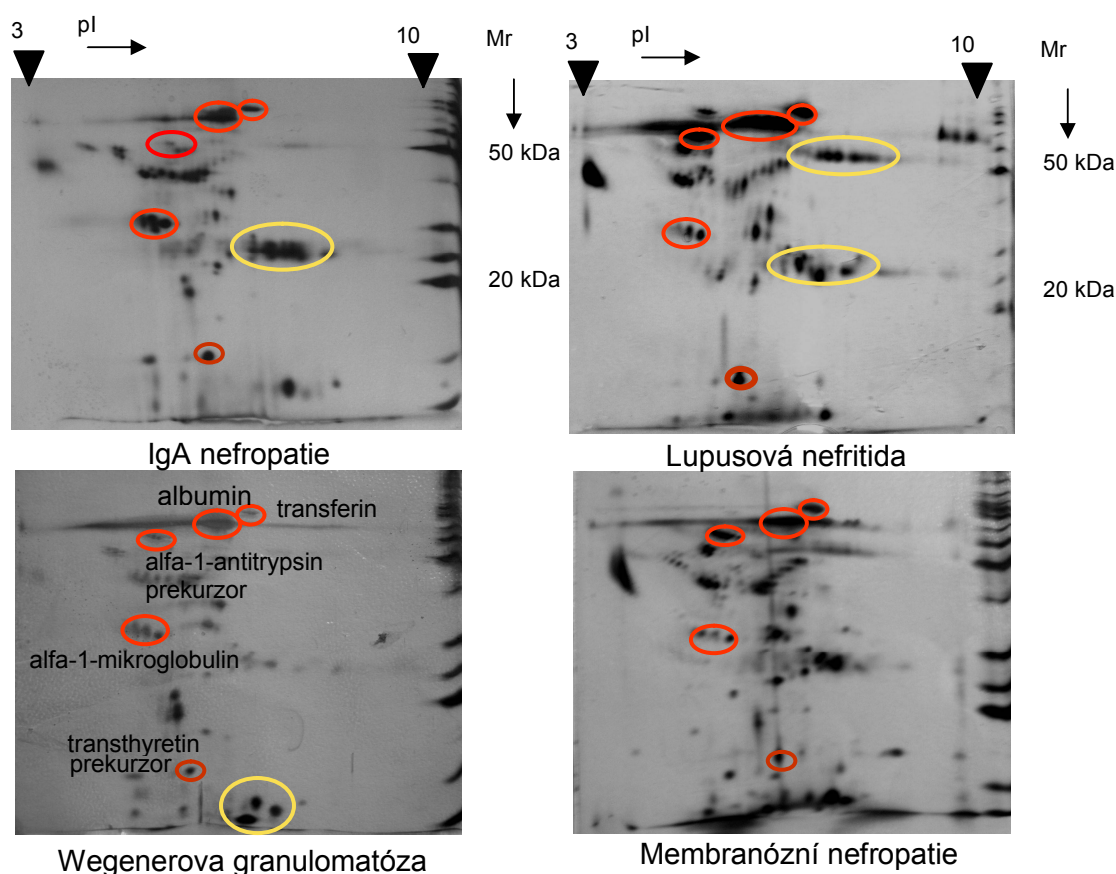
Obrázek 10. Porovnání normalizované kvantity vybraných proteinů mezi vzorky pacientů analyzovaných ihned po sběru (před experimentem), inkubovaných při 37°C s přísávkem (SIN) a bez přísávkem inhibitorů proteáz (BIN).

U vzorků moče analyzovaných ihned po sběru a vzorků analyzovaných po inkubaci s inhibitory proteáz jsme našli podobná spektra proteinů. Z toho vyplývá, že účinek proteáz lze obejít okamžitou analýzou vzorku nebo inhibicí proteolýzy. Na druhé straně mohou proteázy v moči způsobit výrazné změny proteinového spektra, jmenovitě zvýšení množství malých molekul (proteiny kolem 10 kDa) a pokles i nárůst množství molekul s hmotností kolem 50-100 kDa (Tab. VI, Obr. 9, 10).

8.2 Studie proteinů v moči u pacientů s nefrotickou proteinurií

Ze souboru studovaných vzorků moče jsme vybrali vždy deset zástupců od každé ze čtyř nefropatií (IgA nefropatie, lupusová nefritida, Wegenerova granulomatóza, membranózní nefropatie) s proteinurií 5 g za 24h, jejichž elektroforeogramy jsme blíže porovnávali pomocí softwaru Phoretix 2D expression verze 2005. Detekovali jsme výrazně abundantní proteiny, které se vyskytovaly ve všech skupinách a pomocí MALDI-TOF MS jsme je blíže určili jako

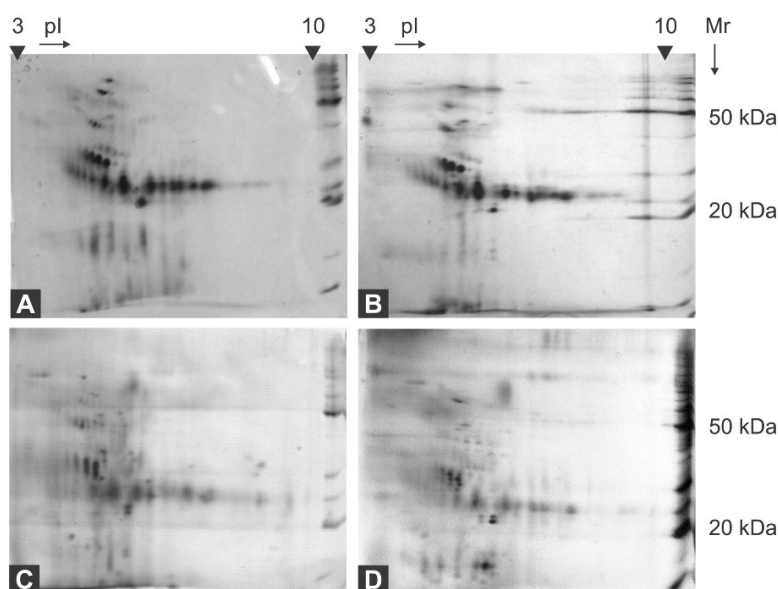
albumin, transferin, alfa-1-antitrypsin prekurzor, alfa-1-mikroglobulin a transthyretin prekurzor. Po podrobném porovnání jednotlivých spekter jsme získali přehled o zastoupení proteinů v moči u jednotlivých nefropatií a našli určité rozdíly ve skupinách proteinů (Obr. 11, žluté označení). Například u membranózní nefropatie jsme pozorovali bohatší spektra proteinů, u Wegenerovy granulomatózy skupinku tří proteinů v oblasti molekulové hmotnosti 10 kDa, pI 7, které jsme u ostatních diagnóz nepozorovali. Konkrétní protein, který by sloužil jako biomarker pro danou diagnózu jsme však nenalezli. Spektra proteinů se i v rámci jednoho onemocnění mírně lišila, kdy příčinou může být stádium onemocnění, léčba, ale také dietní návyky. Studium vybraných proteinů se budeme dále zabývat u vybraných nefropatií u většího počtu vzorků.



Obrázek 11. Srovnání proteinových map. Deset vzorků moče od každé ze čtyř onemocnění (IgA nefropatie, lupusové nefritidy, Wegenerovy granulomatózy, membranózní nefropatie) bylo analyzováno ihned po sběru pomocí 2D techniky. Vybrané proteiny identifikované s využitím MALDI-TOF MS jsou označeny červeně, skupiny proteinů charakteristické pro daná onemocnění žlutě.

8.3 Studie močových proteomů u pacientů s Andersonovo-Fabryho chorobou

V této studii bylo sledováno 20 vzorků moče pacientů s AFD, z toho 13 pacientů bylo podrobena enzym-substituční léčbě a 7 pacientů bylo bez léčby. Ukázky dvou elektroforeogramů jsou znázorněny na obrázku 12. Všechna spektra vzorků s Andersonovo – Fabryho chorobou obsahovaly identické proteiny, a to zejména v oblasti okolo 20-40 kDa. Porovnáním proteinových map pomocí softwaru Phoretix 2D experssion v2005 jsme nenalezli žádný významný rozdíl v rozmístění proteinů na elektroforeogramech u AFD pacientů podstupujících enzym-substituční léčbu ve srovnání s pacienty bez terapie či zdravými jedinci. (Obr. 12)



Obrázek 12. Srovnání 2D elektroforeogramů vzorků moči sbíraných od pacientů s AFD (A- po terapii ERT, B - bez terapie) a zdravých kontrol (C, D). Vzorky moči byly analyzovány ihned po sběru a krátké centrifugaci, s použitím 7 cm polyakrylamidových stripů, pH 3-10L, a SDS-PAGE. Jako marker molekulové hmotnosti byl použit BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen, Glasgow, Great Britain).

U studovaných vzorků jsme v moči nedetekovali žádnou α - gal A aktivitu, kterou jsme měřili na základě publikace (43). Kvantitativní analýza ukázala u AFD pacientů výrazné zvýšení obsahu některých proteinů s molekulovou hmotností kolem 30 kDa. Tento fakt byl

potvrzen pomocí softwaru Phoretix 2D expression 2005, kde jsme získali intenzity kvantit těchto proteinů (Tab. VII).

Tabulka VII. Intenzity kvantit proteinů u pacientů s AFD a zdravých jedinců

Analyzovaná data (intenzita kvantit) pomocí Phoretix 2D expression v2005				
protein	zdraví (průměr ± SD) ^a	AFD-nemocní po terapii ERT (průměr ± SD) ^b	AFD-nemocní bez terapie ERT (průměr ± SD) ^c	p-hodnota*
prostaglandin H2 D- izomeráza	3,11 ± 1,12*	12,41 ± 1,45*	12,45 ± 1,44*	0,000133 ¹⁾
				1,000000 ²⁾
protein komplementu – c1q faktor nekrotizující tumor	3,93 ± 1,31*	12,56 ± 1,35*	11,98 ± 1,61*	0,000133 ¹⁾
				0,999794 ²⁾
Ig kappa řetězce V-III	4,22 ± 0,89*	23,04 ± 1,96*	22,88 ± 1,99*	0,000133 ¹⁾
				1,000000 ²⁾

^{a)} N=10 ^{b)} N=13 ^{c)} N=7 elektroforeogramů získaných z deseti a dvaceti (pacienti AFD bez a po terapii ERT) nezávislých alikvotů moče. * Hodnoty byly analyzovány ANOVA testem na hladině významnosti $p < 0,05$ a porovnávány Tukey HSD testem, ¹⁾ zdraví vs. nemocní AFD po terapii a ²⁾ nemocní po ERT vs. nemocní bez terapie. Změna kvantit proteinů u AFD pacientů byla signifikantně vyšší než u zdravých jedinců.

Vybrali jsme tři proteiny, jejichž kvantita byla u AFD pacientů významně vyšší v porovnání se zdravými kontrolami; Jmenovitě hladiny prostaglandin H2 D-izomerázy a proteinu komplementu – c1q faktor nekrotizující tumor byly u AFD pacientů třikrát vyšší a hladina Ig kappa řetězec V-III byla zvýšena pětkrát oproti zdravým kontrolám. Tab VIII., Obr. 13

Data byla hodnocena ANOVA analýzou při opakovaných měřeních na hladině významnosti $p < 0,05$ jako statisticky významná pro rozdíly mezi kvantitou sledovaných proteinů u pacientů s AFD v porovnání se zdravými jedinci (Obr. 13).

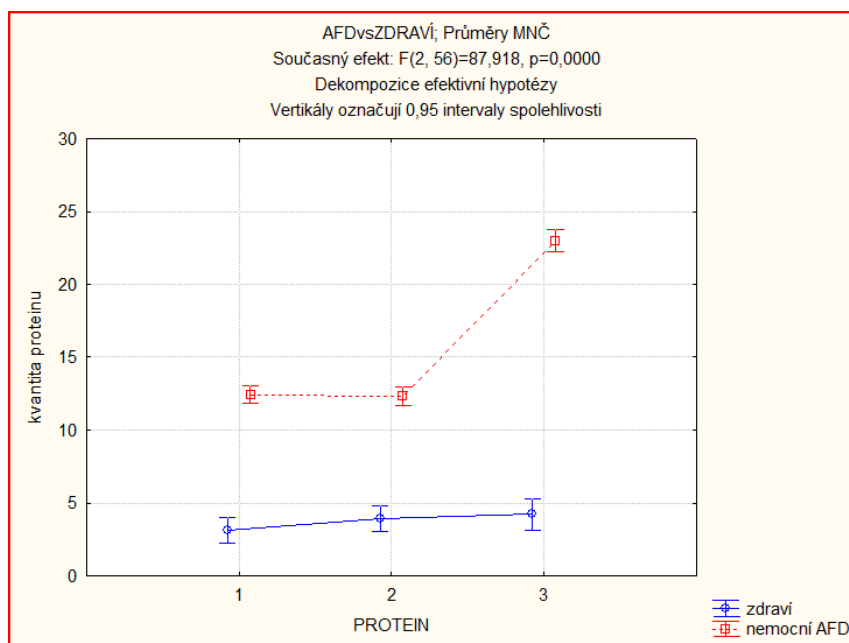
Tabulka VIII. Změny vybraných proteinů získaných softwarem Phoretix 2D expression verze 2005

číslo	Protein	Andersonova- Fabryho choroba (průměrná hodnota \pm SD) % ^a	teoretická mol. w	teoretický pI
1	prostaglandin H2 D-izomeráza	398 \pm 25*	28 kDa	6,1
2	protein komplementu – c1q faktor nekrotizující tumor	289 \pm 17*	23 kDa	5,8
3	Ig kappa řetězce V-III	591 \pm 7*	27 kDa	5,5

* $p < 0.05$ nemocní vs. zdravé kontroly. Vzorky byly sebrány od 20-ti pacientů s AFD

^{a)} $N = 20$: [(množství proteinu ve vzorku s Andersonovo-Fabryho chorobou/ množství proteinu u zdravé kontroly) \times 100]

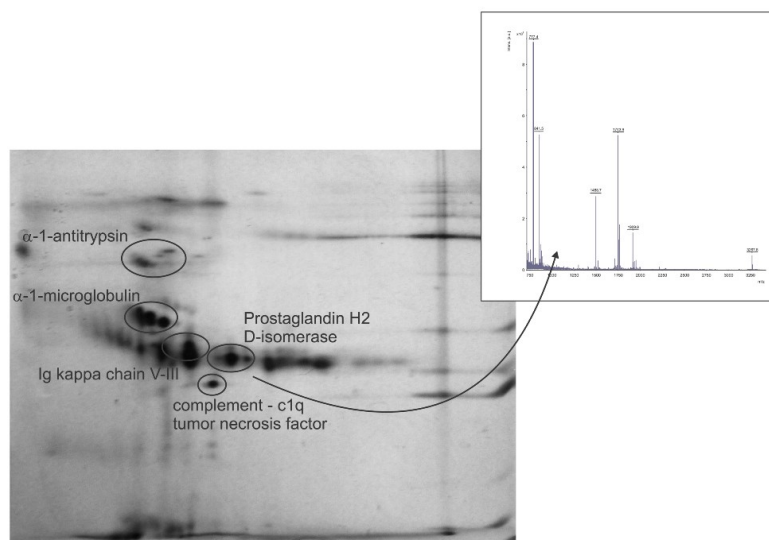
Tukey test byl aplikován na stanovení statistické významnosti ($p < 0,05$) rozdílů mezi jednotlivými proteiny u zdravých jedinců a nemocných AFD a dále nemocných AFD po enzym substituční léčbě vzhledem k nemocným AFD bez léčby. V tabulce VII. jsou znázorněny p-hodnoty získané post-hoc analýzou ukazující statistickou významnost rozdílů kvantity proteinů mezi zdravými jedinci a nemocnými AFD po terapii. Naopak p-hodnoty srovnání kvantity proteinů mezi nemocnými AFD po terapii a nemocnými AFD bez terapie jsou hodnoceny jako statisticky nevýznamné.



Obrázek 13. Znázornění rozdílu normalizované kvantity proteinů mezi zdravými jedinci a nemocnými AFD. Protein 1 - prostaglandin H2 D-izomeráza, protein 2 - protein komplementu – c1q faktor nekrotizující tumor, protein 3 - Ig kappa řetězce V-III

8.3.1 Identifikace proteinů

Některé proteiny byly v moči u pacientů s Andersonovo-Fabryho chorobou exprimovány ve větší míře. Proto byly blíže studovány a podrobeny enzymovému štěpení v gelu a identifikovány pomocí MALDI-TOF MS. V případě, že sekvenční pokrytí studovaného proteinu bylo příliš nízké, byla identifikace proteinu potvrzena MS/MS peptidovým sekvenováním. Abundantní proteiny v gelu byly charakterizovány jako alfa-1-antitrypsin, alfa-1-mikroglobulin, prostaglandin H2 D-izomeráza, protein komplementu – c1q faktor nekrotizující tumor, Ig kappa řetězce V-III. (Obr. 14). Pozice všech identifikovaných proteinů na 2-D gelu byla porovnávána s jejich teoretickým izoelektrickým bodem a molekulovou hmotností (Tab. IX). Většina proteinů se nacházela v předpokládaném rozmezí, kromě prostaglandin H2 D-izomerázy, jejíž experimentální hmotnost byla o 7 kDa vyšší. Blížší identifikace ukázala glykosylaci na místech Asn51 and Asn78.



Obrázek 14. 2-D elektroforeogram proteomu AFD znázorňující všechny identifikované proteiny. Všechny vzorky moče byly analyzovány ihned po sběru s použitím 7 cm polyakrylamidových stripů pH 3-10L a SDS-PAGE.

Tabulka IX. Srovnání experimentálních a teoretických molekulových hmotností a izoelektrických bodů proteinů identifikovaných pomocí MALDI-TOF MS.

číslo	protein	experimentální pI	teoretický pI	experimentální mol. w	teoretická mol. w
1	α-1-antitrypsin	5,1	5,4	48	47
2	α-1-antitrypsin	4,9	5,4	47	47
3	α-1-mikroglobulin/bikunin prekurzor	5,2	5,9	40	40
4	α-1-mikroglobulin/bikunin prekurzor	5,1	5,9	40	40
5	Ig kappa řetězec V-III	5,5	5,8	27	23
6	protein komplementu – c1q faktor nekrotizující tumor	5,8	6,1	23	25
7	prostaglandin H2 D-izomeráza	6,1	7,7*	28	21*

* $p < 0,05$ experimentální versus teoretický parametr, N=20

Množství proteinů v moči u zdravých jedinců zpravidla nepřesahuje 150 mg/ den a jeho zvýšení nad 250 mg/ den upozorňuje na onemocnění ledvin. Proteinurie vyšší jak 3,5 g/ 24h je typická pro nefrotický syndrom, obvykle poukazuje na nějaké primární nebo sekundární poškození glomerulů a hraje významnou roli ve vývoji renálního onemocnění. Nalezení specifického biomarkeru v moči nefrotických pacientů, jenž by byl charakteristický pro dané onemocnění ledvin, by bylo velkým přínosem zejména pro pacienty, kteří by nemuseli být podrobováni nepříjemným a invazivním vyšetřením. Analýza proteinů metodou dvourozměrné elektroforézy, zvláště pak je-li následována MALDI-TOF MS, přináší jasný obraz proteinů zastoupených ve vzorku.

Byly sledovány moče 60-ti pacientů s nefrotickou proteinurií a jinými diagnózami, jejichž proteinurie se pohybovala v rozmezí 0,23 – 19g za 24h. Další skupinou bylo 20 pacientů s Andersonovo-Fabryho chorobou s proteinurií 0,1 – 1 g za 24h. Zavedli jsme 2D metodiku poskytující přehledná spektra proteinů v moči nefrotických pacientů poukazující na proteinové změny. Studie vlivu proteáz na složení proteinů v moči potvrdila, že k

výraznějším změnám kvantity proteinů dochází zejména ve dvou oblastech a to s molekulovou hmotností 50 – 100 kDa a 10 – 20 kDa.

V moči pacientů s nefrotickou proteinurií jsme detekovali výrazně abundantní proteiny, které se vyskytovali ve všech skupinách a pomocí MALDI-TOF MS jsme je blíže určili jako albumin, transferin, alfa-1-antitrypsin prekurzor, alfa-1-mikroglobulin a transthyretin prekurzor. Kvantitativní analýza ukázala u AFD pacientů signifikantně vyšší hladiny ($p < 0,05$) proteinů; proteinu komplementu – C1q faktor nekrotizující tumor, Ig kappa řetězce V-III a prostaglandin H2 D-izomerázy v porovnání se zdravými kontrolami, kdy u posledně zmíněného enzymu byla detekována glykosylace na místech Asn51 and Asn78.

Nyní připravujeme rozšíření našeho výzkumu, kde bychom se rádi zabývali studiem proteinů pomocí dalších technik a to kapalinové chromatografie spojené s MALDI-TOF MS analýzou. Zejména bychom se chtěli věnovat nalezené glykosylaci prostaglandin H2 D-izomerázy u AFD pacientů a ověřit, zda by se mohlo jednat o potenciální biomarker nemoci.

9 Diskuse

Dvou rozměrná elektroforéza následovaná MALDI-TOF MS je výkonným nástrojem ke studiu proteinových změn a identifikaci proteinů. Hlavním cílem mnoha klinických studií využívajících tuto techniku je nalezení možných markerů typických pro dané onemocnění. Studiu proteinů v moči 2D elektroforézou se věnuje stále velké množství výzkumných pracovišť (8, 12, 44) s cílem získání kvalitních spekter pro následnou MALDI-TOF MS analýzu. Pomocí moderních technik hmotnostní spektrometrie se již v lidské moči do dnešní doby podařilo identifikovat minimálně 2500 proteinů, jenž byly získány kombinací tří studií. V roce 2006 Adachi et al.(45) identifikoval 1543 proteinů s využitím hmotnostního spektrometru s Fourierovou transformací v kombinaci (FT-MS) s lineární iontovou pastí (na přístroji LTQ - Orbitrap MS). K dělení proteinů byla využita kapalinová chromatografie a jednorozměrná elektroforéza. Proteom doplnil v roce 2010 Li et al. (46), který použil taktéž hmotnostní spektrometr s lineární iontovou pastí (LTQ-Orbitrap MS) a charakterizoval 1310 proteinů. V roce 2011 jej následoval Marimuthu et al. Detekcí 1823 proteinů pomocí kombinace hmotnostní spektrometrie s 2D elektroforézou a lecitin afinitní chromatografií. (47) Proteomika tedy nabízí široké spektrum možností kombinací separačních technik.

Zejména porovnání spekter proteinů mezi jednotlivými onemocněními ledvin, ale také změny proteinových map u pacientů před a po terapii, mohou vést ke stanovení biomarkerů charakterizujících dané onemocnění. Jak již bylo zmíněno v úvodu tohoto článku, špatnou funkcí ledvin se do moči dostává také větší množství proteáz, které by mohly ovlivnit skutečný obsah a strukturu proteinů v moči při analýze. Obecné laboratorní metody nedovolují detekci těchto molekul proteinů v moči, ačkoliv tyto změny proteinů (například fragmentace proteinů, deglykosylace) mohou souviset s renálním poškozením a být odrazem fáze onemocnění. Proteomická analýza (2D, LC-MS/MS, HPLC-MS/MS) poskytuje ve srovnání s konvenčními metodikami, jako je například Western blot analýza, mnoho výhod,

neboť umožňuje současnou analýzu velkého množství jak očekávaných, tak i neočekávaných proteinů. Naopak Western blot analýza je limitována relativně malým množstvím studovaných proteinů a dostupností specifické protilátky proti hledanému proteinu. Nicméně například HPLC spojená s MS (HPLC-MS/MS) vyžaduje nákladné přístrojové vybavení a hmotnostní spektrometrie je nutná pro všechny analýzy. Sledování proteinových map na 2D gelech se zdá být vhodnou technikou, neboť současná 2D – PAGE poskytuje reprodukovatelná a přehledná spektra proteinů (32). Dřívější studie také ukázaly, že tato technika je vhodná pro proteinovou analýzu živočišných vzorků (48, 49, 50). I 2D elektroforéza má však své nevýhody. Jednou z nich je poměrně dlouhá doba analýzy a obtížná automatizace. Dalším limitujícím faktorem je nemožnost studia peptidů (peptidy/proteiny s nižší molekulovou hmotností než 10 kDa). (51)

Právě moč je však velmi vhodnou tekutinou ke studiu onemocnění ledvin, díky své snadné dostupnosti a neinvazivním odběrem od pacientů.

9.1 Optimalizace metodiky 2D elektroforézy

Cílem našeho studia bylo připravit vzorky moči a optimalizovat 2D analýzu tak, abychom omezili ztráty či změny proteinů již před samotnou analýzou a prokázali vliv proteáz na proteinové mapy pacientů. Vzorky byly ve většině případů zpracovávány ihned po sběru, čímž bylo zamezeno ztrátě proteinů vlivem jiných faktorů. Pro pozdější analýzy byly vzorky ihned zamrazeny na -80 °C. Stabilita vzorků v průběhu skladování byla ověřena opakovanou analýzou daného vzorku moče po 30 dnech od první analýzy. Ze získaných proteinových obrazů je patrné, že uvedené skladování nemá u zkoumaných vzorků vliv na zastoupení jednotlivých proteinů ve vzorku. Naopak jiná studie Saetun et. al (52) charakterizovala vznik precipitátů v moči při zamražení na -20 °C, které mohou ovlivnit následnou analýzu. Lze je však rozpustit intenzivním třepáním a proto je potřeba brát na tyto precipitáty zřetel, pokud jsou vzorky zamrazeny na tuto teplotu.(52) Samotnou přípravou

vzorků před analýzou se zabývalo mnoho studií, příkladem může být Magistroni, jenž porovnával protein extrakční metody s využitím acetonu, ultrafiltrace a trichloroctové kyseliny. Jako nejlepší zhodnotil extrakci proteinů acetonem, druhou hned ultracentrifugaci. (53) V našem studiu jsme s uspokojivými výsledky použili k zahuštění proteinů u pacientů s nízkou koncentrací proteinů v moči metodu centrifugace. U nefrotických pacientů byla koncentrace proteinů dostačující tak, aby nemusela být žádná koncentrační metoda použita.

Již dřívější studie stanovení proteinů v moči 2D elektroforézou upozornila na přítomnost interferujících látek, které mohou negativně ovlivňovat analýzu pomocí izoelektrické fokusace (49). Abychom zamezili těmto problémům, aniž bychom vzorky před analýzou podrobovali dialýze a následné lyofilizaci (49), aplikovali jsme na polyakrylamidový strip omezené množství proteinů a vizualizaci prováděli citlivou detekcí stříbrem.

Albumin je nejvýrazněji zastoupenou bílkovinou séra a tedy i moče. Molekulová hmotnost albuminu je 67 kDa, v moči pacientů se však nevyskytuje pouze albumin o této hmotnosti, ale také různé fragmenty tohoto hojně zastoupeného proteinu. Jak je zřejmé z obrázku 4, odstraněním albuminu metodou vysolování došlo k jasnějšímu obrazu spektra proteinů a výraznému snížení obsahu albuminu ve vzorku především v oblasti o molekulové hmotnosti 67 kDa. Tento fakt byl ověřen jednorozměrnou SDS-PAGE elektroforézou, kde se v supernatantové frakci po centrifugaci vyskytoval pouze albumin (Obr. 6). Precipitace proteinů síranem amonným je vhodná také pro analýzu vzorků s nízkým obsahem proteinů. Jako optimální koncentrace této soli ve vzorku se ukázala hodnota 75% (54). Albumin je možno odstranit také s využitím kitu Affi-Gel Blue agarose od firmy Biorad (49), kdy byla pozorována obdobná projasnění spekter proteinů jako u námi použité metodiky. Jiná studie (55) potvrdila, že stejné změny byly prokázány při separaci albuminu také u vzorků séra. Na světě je k dispozici samozřejmě mnoho dalších komerčně připravených preparátů odstraňujících zároveň IgG a albumin z moči. Jak uvedl Magistroni et al.(53) liší se specifitou

a množstvím odstraněného albuminu. Je proto vhodné před konkrétním experimentem vyzkoušet vhodnou metodiku separace. Těmito metodami však nedochází k odstranění fragmentů albuminu, které mohou mít toxický účinek na tubulární buňky. Bylo prokázáno (56), že albumin není specifickým ukazatelem diagnózy. Běžně se vyskytuje jak u zdravých tak i nemocných jedinců. Odstraněním albumin ze vzorků tedy nepřicházíme o detekci případných markerů charakterizujících danou nemoc.

Přítomnost proteázy a její účinky na degradaci proteinů jsme ověřili stabilitní studií při fyziologické teplotě 37 °C po dobu 48h. V případě, že jsme ke vzorkům přidali koktejl inhibitorů proteáz, došlo jen k velmi malým změnám v proteinovém spektru v porovnání se vzorky analyzovanými ihned po sběru. Například u proteinu s molekulovou hmotností 48 kDa (protein 2), který jsme později pomocí MALDI-TOF MS identifikovali jako α -1-antitrypsin, jsme u všech vzorků bez přídavku inhibitorů pozorovali pokles kvantity, jenž by mohl být vysvětlen účinkem proteáz. Vzhledem k tomu však, že tento protein byl charakterizován jako sérový proteázový inhibitor, mohl by být jeho úbytek vysvětlen také interakcí proteáza-inhibitor. α -1-antitrypsin je tvořen v játrech a je známý jako reaktant akutní fáze. Jako proteázový inhibitor inaktivuje elastázu neutrofilů v plicní tkáni. Zvýšenou koncentraci v séru můžeme pozorovat při infekci. Naopak nižší hladina bývá důsledkem onemocnění ledvin především u nefrotického syndromu. Zajímavým srovnáním může být studie Magistriho z roku 2009 (53), kde se zabývali proteolytickou aktivitou v moči u nefrotických pacientů ve srovnání s pacienty s močovými abnormalitami (mikrohématurie či proteinurie bez nefrotického syndromu). Pomocí 1D a 2D western blot analýzy detekovali výraznou proteolytickou aktivitu vůči albuminu u pacientů s nefrotickým syndromem. Rozdílným zjištěním vzhledem k naší studii bylo výrazně zvýšení hladiny α -1-antitrypsinu (53), kdy my jsme u pacientů s nefrotickým syndromem pozorovali naopak pokles hladiny tohoto proteinu. Vysvětlením by mohl být samozřejmě fakt, že jsme vzorky před analýzou inkubovali při 37°C po dobu 48h bez přítomnosti inhibitorů proteáz. Jak je ale uvedeno ve

zmíněné publikaci vztah mezi proteolytickou aktivitou proti albuminu a výrazné hladině proteinu α -1-antitrypsinu je nutné adresovat dalším studiím.

V případě proteinu 2 a proteinu označeného na gelu číslem 3, došlo u vzorků s přidavkem inhibitorů naopak ke zvýšení jejich zastoupení. Vysvětlením by u proteinu 3 mohla být degradace proteinu o vyšší molekulové hmotnosti (například albuminu) způsobená 48 hodinovou inkubací při teplotě 37 °C. Teplotní degradace však nemusí být tak účinná jako štěpení proteinů enzymy a proto nedojde k výraznějšímu rozkladu proteinů na menší fragmenty. Zvýšené množství kvantitativně pozorujeme tedy v oblasti s vyšší molekulovou hmotností jak 30 kDa v porovnání se vzorky bez inhibitorů pouze u proteinu označeným číslem 2 a 3. Zvláště patrný je tento fakt u obrázku 9 D). Vyšší obsah proteinu 2 je ovšem s největší pravděpodobností důsledkem přidavku koktejlu inhibitorů proteáz ke vzorku. Inkubace vzorků bez přidavku inhibitorů způsobila rozsáhlejší změny proteinů a to v oblasti kolem molekulové hmotnosti 50 kDa. Zvýšená proteolýza je patrná také u proteinů s molekulovou hmotností nižší než 20 kDa, zejména u pacienta B, který obsahoval neobvykle velké množství proteinů v oblasti o molekulové hmotnosti 30 kDa. Z tohoto důvodu je možno předpokládat, že v oblasti kolem 10 kDa se nacházejí převážně degradační produkty. Tento pokus nám naznačuje, že proteázy mají pravděpodobně svou funkci při degradaci proteinů při tubulárních pochodech a mohou být nezbytné pro zpětné vstřebávání proteinů tubulárními buňkami. Lze předpokládat, že proteolytické procesy budou přítomny i při pokojové teplotě, pravděpodobně však budou probíhat pomaleji. Proto je vhodné tyto vzorky ihned zpracovat nebo zamrazit při -80 °C, neboť tímto postupem jsme prokázali stabilitu po dobu minimálně půl roku. Z trochu jiného pohledu se na problematiku proteáz a zamražení vzorků zaměřili Havanapan a Thoonboonkerd (2009) (57), kteří zjistili, že opětovné zamražení a rozmražení vzorků (sledováno v 1-12 cyklech) bez přítomnosti proteáz ovlivňuje kvalitu i kvantitu renálních proteinů zamražených při -30°C a -70°C po čtvrtém rozmražení. Naopak močové proteiny zůstaly bez přítomnosti proteáz při obou teplotách nezměněny i po dobu 12-ti

rozmražení a není tedy nutné dodávat inhibitory proteáz, čímž byla potvrzena také naše stabilitní studie. Na druhou stranu byl ve studii Havanapan a Thoonboonkerd (57) sledován pouze jeden typ inhibitoru proteáz a močové proteiny u zdravých jedinců, určitě by bylo zajímavé otestovat z tohoto hlediska i jiné typy inhibitorů. V naší studii jsme naopak u nefrotických pacientů našli výraznou proteolýzu. Nutno určitě podotknout, že vzorky byly inkubovány při fyziologické teplotě, nikoliv ihned zamrazeny či analyzovány, každopádně přidavek inhibitoru proteáz je v těchto případech určitě vhodný.

Ke zvýšení koncentrace proteáz v moči může docházet také u akutní pankreatidy či nádorových onemocnění. Tento fakt potvrzují studie (58, 59), kde byly hodnoty koncentrace příslušných enzymů označeny dokonce diagnostickými markery choroby.

9.2 Srovnání proteinových map u nefropatií

Získat soubor s přesně definovanými parametry v rámci určité skupiny onemocnění je velmi problematickou záležitostí, neboť močový proteom je během dne velmi proměnlivý. Tyto změny jsou způsobeny jednak životním stylem, tak také metabolickými či katabolickými procesy, ale také srdečním rytmem (51).

V naší studii jsme obdrželi elektroforeogramy s proteinovými spektry u 60-ti vzorků moče pacientů s nefrotickým syndromem či jinými nefropatiemi s různě závažnou proteinurií. Všechny vzorky jsme sledovali z hlediska věku a pohlaví pacienta, renální funkce, hodnoty proteinurie, ale také fáze onemocnění. Tyto skupiny pacientů jsme se snažili co nejpřesněji roztrždit dle těchto kritérií, přesto však byly nálezy proteinů ve skupinách velmi proměnlivé a těžko jsme hledali konkrétní protein, který by vybranou skupinu charakterizoval. Metabolické pochody jsou u lidí velmi rozdílné a každé onemocnění se u jednotlivců projeví z části jinak. Příčinnou námi zjištěné rozličnosti proteinů je pravděpodobně specifická odpověď organismu na dané onemocnění. U všech studovaných skupin onemocnění (IgA nefropatie, lupusová nefritida, Wegenerova granulomatóza, membranózní nefropatie) jsme detekovali výrazně

abundantní proteiny, které se vyskytovali ve všech skupinách a pomocí MALDI-TOF MS jsme je blíže určili jako albumin, transferin, alfa-1-antitrypsin prekurzor, alfa-1-mikroglobulin a transthyretin prekurzor. Poslední zmiňovaný protein byl ve studii IgA nefropatie technikou nano-vysokotlaké kapalinové chromatografie spojené s hmotnostním spektrometrem s elektrosprejovou ionizací (nano-HPLC-ESI-MS/MS) spolu s kininogenem označen jako potenciální biomarker nemoci (60). Další studie využívá metodiku kapilární elektroforézy CE-MS (61) k nalezení markerových polypeptidů pro porovnání IgA nefropatie, membranózní nefropatie a zdravých jedinců. Všechny sledované polypeptidy jsou v rozmezí 900 - 6000 Da. Také současné laboratorní markery pro lupusovou nefritidu (proteinurie, močový protein/kreatinin poměr, clearance kreatininu) jsou velmi neuspokojivé. Pomocí SELDI-TOF MS (surface-enhanced laser desorption/ionization TOF MS) (62) Suzuki v roce 2009 identifikoval prostaglandin D-syntetázu, transferin, ceruloplasmin, α 1-acid-glykoprotein, které byly zvýšeny u pacientů s nefritidou. Později podobnou technikou Mosley (63) stanovil, že rozdíly mezi aktivní a inaktivní LN nejlépe vystihují peptidy v rozmezí molekulových hmotností 3000-4000Da (64). Z těchto poznatků vyplývá, že analýza proteinů v moči je potenciálně použitelné při počáteční detekci nemoci a k sledování odpovědi na léčbu. Další ověření jsou však nutná (65). Po podrobném porovnání námi analyzovaných spekter jsme získali přehled o zastoupení proteinů v moči u jednotlivých nefropatií a našli tedy pouze určité rozdíly ve skupinách proteinů (Obr. 11, žluté označení). Konkrétní protein, který by sloužil jako biomarker dané diagnózy jsme však nenalezli. Jak je patrné z poznatků i z jiných studií (62, 64, 65) možné markery nemoci odpovídají spíše proteinům s nižší molekulovou hmotností kolem 4000 Da. V této oblasti je 2D elektroforéza značně limitující, neboť poskytuje přehledný obraz proteinů nad 10 kDa.(51) Velikost dělených proteinů totiž závisí na zvoleném pH pro IEF a velikost pórů v gelu, kdy reprodukovatelné výsledky jsou poskytovány především při molekulové hmotnosti nad 10 kDa.

9.3 Porovnání skladby proteinů u AFD a zdravých kontrol

Po sledování močových proteomů u nefropatií jsme se zaměřili na analýzu skladby proteinů u závažného geneticky podmíněného lyzozomálního onemocnění Andersonovu-Fabryho chorobu. Zaměřili jsme se na porovnání proteinů v moči u AFD vzhledem ke zdravým jedincům. Mezi zdravými kontrolami a AFD pacienty jsme nenalezli žádné významné rozdíly v počtu proteinů, proto můžeme konstatovat, že nemoc nevede ke tvorbě nových proteinů či degradačních produktů. Tento závěr může být také potvrzen srovnáním spekter získaných u AFD pacientů a proteinových spekter nefrotických pacientů, kde je množství detekovaných proteinů na gelu mnohem vyšší než u zdravých jedinců. (Příloha 1, 2) Ačkoliv jsme nedetekovali kvalitativní změny proteinů, zaznamenali jsme změny v kvantitě. Předpokládáme, že zvýšené množství proteinů v moči je zapříčiněno nemocí, neboť AFD je obvykle spojeno s porušením funkce proximálního tubulárního systému. Porušením funkce proximálního tubulu vede ke špatné reabsorpci filtrovaných látek, zvláště nízkomolekulárních proteinů. Většina identifikovaných proteinů patřila mezi plazmové proteiny a při normálních podmínkách by byly reabsorbovány v proximálním tubulu pomocí receptorů zprostředkovaných endocyózou. Na druhou stranu, analýza kvantitativních změn odhalila značně zvýšené hladiny Ig kappa řetězce V-III, proteinu komplementu – c1q faktor nekrotizující tumor a prostaglandin H2 D-isomerézy. Hladiny prvních dvou proteinů byly zvýšeny více jak třikrát a hladina prostaglandin H2 D-isomerézy více jak pětkrát vzhledem k příslušným hodnotám u kontrolních jedinců. Poslední protein hraje důležitou úlohu v regulaci fosfolipidového metabolismu (6) a jeho sekrece je výrazně zvýšena u pacientů s chronickým renálním onemocněním (66, 67, 68). Vyšší hladiny těchto tří proteinů mohou být způsobeny zvýšenou syntézou nebo zvýšenou propustností glomerulární bazální membrány (69, 70). Nejpravděpodobnější příčinou se jeví porušení sekrečně-reabsorpčních tubulárních mechanismů vlivem lyzozomálních vakuol ovlivňujících tubulární systém. Neboť

skladba proteinů identifikovaných u AFD pacientů je velmi podobná proteomu, který byl nalezen u pacientů s tubulární proteinurií (6, 71). Jiné změny v exkreci proteinů byly představeny v histochemické studii (72) ukazující, že močová exkrece integrinu β_3 vznikajícího z vitronektinového receptoru byla u AFD pacientů významně zvýšena ve srovnání se zdravými kontrolami. Konečně, abundatní proteiny identifikované na 2-D gelech byly podrobeny MALDI-TOF MS analýze. Všech sedm studovaných proteinů (alfa-1-antitrypsin, alfa-1-mikroglobulin, prostaglandin H2 D-izomeráza, protein komplementu – c1q faktor nekrotizující tumor, Ig kappa řetězec V-III) bylo také nalezeno u zdravých jedinců. Pozice všech proteinů na 2D gelu odpovídala jejich teoretickým izoelektrickým bodům a molekulovým hmotnostem, kromě H2 D-izomerázy. Předpokládáme, že změna v molekulové hmotnosti enzymu a jeho izoelektrickém bodě, může být způsobena glykosylací H2 D-izomerázy v místě Asn51 a Asn78. Glykosylační změny proteinu mohou být významné a mohou sloužit jako potenciální biomarkery. Avšak tyto předpoklady musejí být potvrzeny následujícími studii sledujícími vztah mezi výše zmíněnými zjištěními vzhledem k vážnosti a progresi onemocnění. Mnoho článků publikovaných minulý rok bylo zaměřeno na klinické studie různých typů terapie AFD (73), studie vlivu enzym-substituční léčby na pacienty (74) nebo studii pacientů léčených α -galaktozidázou A (glykoprotein o molekulové hmotnosti 101 kDa s homodimerní strukturou) z důvodu snížení globotriaoylceramidových zásob ve tkáních. (27) David Moore v roce 2009 sledoval vliv ERT na sérové proteiny pomocí izotopového značení a následné nanoHPLC tandemové hmotnostní spektrometrie, kde zaznamenal pokles hladiny některých proteinů. (75) My jsme měli možnost sledovat proteinová spektra pacientů podléhajících léčbě vůči neléčeným pacientům s AFD a v moči jsme žádné rozdíly mezi proteiny nezaznamenali. Jak je uvedeno v publikaci Schiffmanna (76) spolehlivé biomarkery této nemoci jsou a budou i nadále předmětem dalších studií a stejně tomu zůstává také u ostatních nefropatií.

10 Závěr

1. Zaměřili jsme se na analýzu proteinů přítomných v moči pacientů s onemocněním ledvin. Zavedli jsme a optimalizovali jsme 2D techniku tak, aby nám poskytovala přehledná spektra proteinů, která se v moči pacientů s nefrotickým syndromem a s primárními glomerulopatiemi vyskytují. Dále jsme sledovali vliv odstranění albuminu pro analýzu vzorku a účinek proteáz na zastoupení proteinů ve vzorku moči. Zjistili jsme, že vzorky jsou stabilní minimálně 6 měsíců, pokud je vzorek uchováván při -80 °C.

Doporučujeme u vzorků s koncentrací albuminu vyšší než 3 g/24h aplikovat metodu odstranění albuminu síranem amonným, protože odstranění albuminu zlepšuje přehlednost celého spektra a zvýrazní se rozlišení proteinů zejména v oblasti > 30 kDa.

Studie vlivu proteáz na složení proteinů v moči potvrdila u všech pěti různých vzorků s primární glomerulopatií, že k výraznějším změnám kvantity proteinů dochází zejména ve dvou oblastech a to s molekulovou hmotností 50 – 100 kDa a 10 – 20 kDa. Proteázy pravděpodobně hrají svou úlohu při degradaci proteinů při tubulárních pochodech. Porovnáním jednotlivých proteinových map sledovaných vzorků moči je patrné, že bez přítomnosti inhibitorů proteáz dochází k proteolýze projevující se zvýšeným množstvím proteinů v oblasti 10 kDa a naopak úbytkem proteinů s vyšší molekulovou hmotností (89 a 64 kDa).

2. Získali jsme elektroforeogramy s proteinovými spektry u 60-ti vzorků moče pacientů s nefrotickým syndromem či jinými nefropatiemi s různě závažnou proteinurií. Detekovali jsme výrazně abundantní proteiny, které se vyskytovaly ve všech skupinách onemocnění a pomocí MALDI-TOF MS jsme je blíže určili jako albumin, transferin, alfa-1-antitrypsin prekurzor, alfa-1-mikroglobulin a transthyretin prekurzor. Po podrobném porovnání jednotlivých spekter jsme získali přehled o zastoupení proteinů v moči u jednotlivých nefropatií a našli určité rozdíly ve skupinách proteinů. U membranózní nefropatie jsme pozorovali bohatší spektra proteinů, u Wegenerovy granulomatózy skupinu tří proteinů v oblasti molekulové hmotnosti 10 kDa, pI 7, které jsme u ostatních diagnóz nepozorovali. Konkrétní protein, který by sloužil jako biomarker pro danou diagnózu jsme však nenalezli. Spektra proteinů se i v rámci jednoho onemocnění mírně lišila, kdy příčinou může být stádium onemocnění, léčba, ale také dietní návyky. Studium vybraných proteinů se budeme dále zabývat u zvolených nefropatií a většího počtu vzorků.

3. Byly studovány vzorky 20-ti pacientů s Andersonovo-Fabryho chorobou (11 mužů, 9 žen, ve věku 18-69 let) s proteinurií v rozmezí mezi 0,1 – 1 g/24h. Všechna spektra vzorků s Andersonovo – Fabryho chorobou obsahovaly identické proteiny, a to zejména v oblasti okolo 20-40 kDa. Nenalezli jsme žádný významný rozdíl v rozmístění proteinů na elektroforeogramech u AFD pacientů podstupujících enzym-substituční léčbu ve srovnání s pacienty bez terapie či zdravými jedinci. Kvantitativní analýza ukázala u AFD pacientů výrazné zvýšení obsahu některých proteinů s molekulovou hmotností kolem 30 kDa. Byly vybrány a pomocí MALDI-TOF MS identifikovány tři proteiny, jejichž kvantita byla u AFD pacientů významně vyšší v porovnání se zdravými kontrolami; Jmenovitě hladiny prostaglandin H2 D-izomerázy a proteinu komplementu – c1q faktor nekrotizující tumor byly u AFD pacientů třikrát vyšší a hladina Ig kappa řetězce V-III byla zvýšena pětikrát oproti zdravým kontrolám. Dále byly MALDI-TOF MS technikou charakterizovány další abundantní proteiny jako alfa-1-antitrypsin, alfa-1-mikroglobulin, prostaglandin H2 D-izomeráza, protein komplementu – c1q faktor nekrotizující tumor, Ig kappa řetězce V-III. Pozice všech identifikovaných proteinů na 2-D gelu byla porovnávána s jejich teoretickým izoelektrickým bodem a molekulovou hmotností. Většina proteinů se nacházela v předpokládaném rozmezí, kromě prostaglandin H2 D-izomerázy. Tato výjimka může být způsobena glykosylací na místech Asn51 and Asn78.

Nyní připravujeme rozšíření našeho výzkumu, kde bychom se rádi zabývali studiem proteinů pomocí dalších technik a to kapalinové chromatografie spojené s MALDI-TOF MS analýzou. Zejména bychom se chtěli věnovat nalezené glykosylaci prostaglandin H2 D-izomerázy u AFD pacientů a ověřit, zda by se mohlo jednat o potenciální biomarker nemoci.

11 Literatura

1. Tesař V, Schück O a kolektiv: Klinická nefrologie. Grada Publishing Praha 2006; 652 s.
2. Karlson P, Gerok W, Gross W. Pathobiochemie. Academia, Praha 1987: 480 s.
3. Weatherall D. J., Ledingham J. G. G, Warell D. A.: Oxford textbook of medicine, third edition, volume 3, sections 20 Nephrology, Oxford University Press. 1996; 4376 p.
4. Teplan V. a kolektiv: Praktická nefrologie 2. zcela přepracované a doplněné vydání, Grada Publishing a.s. 2006; 536 s.
5. Eiselt J.: Funkční zkoušky ledvin. In Racek J. et al.: Klinická Biochemie, druhé přepracované vydání, Galén, Praha 2006; str. 225-238.
6. Tesar V, Zima T, Kalousova M. Pathobiochemistry of nephrotic syndrome. Adv Clin Chem. 2003; 37: 173–218.
7. Zima T.: Biochemie ledvin. In Matouš B et al.: Základy lékařské chemie a biochemie, Galén, Praha 2010; str. 445-452.
8. Pieper R, Gatlin ChL, McGrath AM. Characterization of the human urinary proteome: A method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. Proteomics. 2004; 4: 1159–1174.
9. Schuck O., Tesar V., Teplan V.: Klinická nefrologie, Medprint, Praha 1995: 406 s
10. Bernard A, Vivian C, Ouled A, Lauwerys R. Competition between low-and-hogh-molecular weight proteins for renal tubular uptake. Nephron; 1987; 45: 115-118.
11. Murray R. K, Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: Harperova Biochemie, H+H, Praha 2002; 872 s
12. Cutillas PR, Chalkley RJ, Hansen KC, 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: F353–F364.

13. Masopust J.: Zdravotnické aktuality 216, Avicenum 1990
14. Nejedlý, B., Tobiška, J., Zahradníček, L.: Basic and Morphological Urine Examinations. Ministry of Health of the Czech Republic, 1986.
15. Engliš, M.: Proteinuria. Stapro s.r.o, Pardubice 1995.
16. Tesař V.: Laboratorní diagnostika v nefrologii. In. Zima, T. a kol. : Laboratorní diagnostika, 2. vyd Galén Karolinum, Praha 2007; str. 119-135.
17. Beck M, Ricci R, Widmer U, et al. Fabry disease: Overall effects of agalsidase alfa treatment. *Eur J Clin Invest.* 2004; 34: 838–844.
18. Mehta A, Ricci R, Widmer U, et al. Fabry disease defined: Baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *Eur J Clin Invest.* 2004; 34: 236–242.
19. Schiffmann R, Murray GJ, Treco D, et al. Infusion of α -galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 365–370.
20. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, et al. High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet.* 2006; 79: 31–40.
21. Elleder M. Sequelae of storage in Fabry disease – pathology and comparison with other lysosomal storage diseases. *Acta Paediatr Suppl.* 2003; 92: 46–53.
22. Linhart A, Palecek T, Bultas J, et al. New insights in cardiac structural changes in patients with Fabry's disease. *Am Heart J.* 2000; 139: 1101–1108.
23. Linhart A, Elliott PM. The heart in Anderson-Fabry disease and other lysosomal storage disorders. *Heart.* 2007; 93: 528–535.
24. Richard J, Schultz M.: Part III Functions of Proteins. In Devlin T. M: *Textbook of Biochemistry with clinical Correlations*, sixth edition Wiley-Liss, USA, 2006; p. 319-339.

25. MccDermot J, Holmes A, Miners A. Anderson-Fabry disease: Clinical manifestations in a cohort of 60 obligate carrier females. *J Med Genet.* 2001; 38: 769–775.
26. Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, et al. Safety and efficacy of recombinant human α -galactosidase A-replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med.* 2001; 345:9–16.
27. Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: A randomized controlled trial. *J Am Med Assoc.* 2001; 285: 2743–2749.
28. Banikazemi M, Bultas J, Waldek S, et al. Agalsidase-beta therapy for advanced Fabry disease: A randomized trial. *Ann Intern Med.* 2007; 146: 77–86.
29. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105(8): 2812–2817.
30. Schiffmann R, Waldek S, Benigni A, Auray-Blais Ch. Biomarkers of Fabry disease nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010; 5(2): 360–364.
31. Alberts B. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* 92. 1998; 291.
32. Thongboonkerd, V. Proteomics in nephrology: current status and future directions. *Am. J. Nephrol.* 2004; 24, 360-378.
33. Ezzell C. Proteomics-Biotech's Next Big Challenge. *Sci..Am.* 2002; 28-34.
34. Görg A. 2-D electrophoresis-Principles and Methods. GE Healthcare Biosciences AB 2004; p. 9-110.
35. Hillenkamp F, Peter-Katalinic J. MALDI MS – A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications. WILEY, Münster 2007; p. 5-102.
36. V. Kadlčík, M. Kodíček, M. Hassman: Využití hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF pro studium prostorové struktury proteinů. *Chem. Listy.* 2002; 96, 618-623.
37. Biosystems. Protein Spectrophotometric PYROGALLOL RED. 2005

38. Watanabe N, Kamei S, Ohkubo A. Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clin Chem.* 1986; 32: 1551–1554.
39. Joo, W.- A., Lee, D.-Y., Kim, Ch.-W. Development of an effective sample preparation method for the proteome analysis of body fluids using 2-D gel electrophoresis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003; 67: 1574-1577.
40. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: p. 248.
41. Amresco. Silver BULLit™ Silver Stain Kit – Directions for use. 2005
42. Harlow E, Lane D. *Using Antibodies: a Laboratory Manual/Portable Protocols.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. N. Y., 1999; p. 436
43. Dean KJ, Sung SS, Sweeley CC. The identification of alpha-galactosidase B from human liver as an alpha-N-acetylgalactosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1977; 77(4): 1411–1417.
44. Rossing K, Mischak H, Parving H-H. Impact of diabetic nephropathy and angiotensin II receptor blockade on urinary polypeptide patterns. *Kidney Int.* 2005; 68: 193–205.
45. Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen J V, Mann M. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome. Biol.* 2006; 7 (9), R80
46. Li Q R, Fan K X, Li R X, Dai J, Wu C C, Zhao S L, Wu J R, Shieh C H, Zeng R. A comprehensive and non-prefractionation on the protein level approach for the human urinary proteome; touching phosphorylation in urine. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 2010; 24 (6), 823-32.
47. Marimuthu A, O’Meally R N, Chearkady R, Subbannayya Y, Nanjappa V, Kumar P,

- Kelkar D S, Pinto S M, Sharma R, Renuse S, Goel R, Christopher R, Delanghe B, Cole R N, Harsha H C and Pandey A. A Comprehensive Map of the Human Urinary Proteome. *J. Proteom. Res.* 2011; 10, 2734-2743.
48. Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 17, 9390-9395.
49. Oh J, Pyo OJ, Jo E-H, Hwang S, Kang S-Ch, Jung J-H, Park E-K, Kim S-I, Chol J-Y, Lim J. Establishment of a near-standard two-dimensional human urine proteomic map. *Proteomics* 4. 2004; 3485-3497.
50. Washburn MP, Wolters D, Yates JR. Large-scale analysis of the yeast proteome via multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* 2001; 19, 242-247.
51. Decramer S, Pedero A G, Breuil H M, Monsarrat B, Bascands J L, Schanstra J P. Urine in Clinical Proteomics. *Mol. & Cell. Proteom.* 2008; 7, 1850-1862.
52. Saetun P, Semangoen T, Thongboonkerd V. Characterizations of urinary sediments precipitated after freezing and their effects on urinary protein and chemical analyses. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2009; 296, F1346 – F1354.
53. Magistroni R, Ligabue G, Lupo V, Furci L, Leonelli M, Manganelli L, Masellis M, Gatti V, Cavazzini F, Tizzanini W, Albertazzi A. Proteomic analysis of urine from proteinuric patients shows a proteolytic activity directed against albumin. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009; 24, 1672-1681.
54. Thongboonkerd V, Chutipongtanate S, Kanlaya R. Systematic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics: quantity, quality, and variability. *J. Proteom. Res.* 2006; 5, 183-191.
55. Ahmed N, Barker G, Oliva K, Garfin D, Talmadge K, Georgiou H, Quinn M, Rice G. An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance

- biomarkers in human serum. *Proteomics* 2003; 10, 1980-1987.
56. Jain S, Rajput A, Kumar Y, Uppuluti N, Arvind AS, Tatu U. Proteomic analysis of urinary protein markers for accurate prediction of diabetic kidney disorder. *J. Assoc. Physicians India* 2005; 53, 513-520.
 57. Havanapan P, Thongboonkerd V. Are Protease Inhibitors Required for Gel-Based Proteomics of Kidney and Urine? *J. Proteom. Res.* 2009; 8, 3109-3117.
 58. Sáez J, Martínez J, Trigo C, Sánchez-Payá J, Company L, Laveda R, Grinó P, García C, Pérez-Mateo M. Clinical value of rapid urine trypsinogen-2 test strip, urinary trypsinogen activation peptide, and serum and urinary activation peptide of carboxypeptidase B in acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11, 7261-7265.
 59. Botchkina GI, Kim RH, Botchkina IL, Kirshenbaum A, Frischer Z, Adler HL. Noninvasive detection of prostate cancer by quantitative analysis of telomerase activity. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11, 3243-3249.
 60. Rocchetti MT, Centra M, Papale M, Bortone G, Palermo C, Centonze D, Ranieri E, Paolo SD, Gesualdo L. Urine protein profile of IgA nephropathy patients may predict the response to ACE-inhibitor therapy. *Proteomics* 2008; 8(1): 206-216.
 61. Haubitz M, Wittke S, Weissinger EM, Walden M, Rupprecht HD, Floege J, Haller H, Mischak H. Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2005; 67(6): 2313-2320.
 62. Suzuki M, Wiers K, Brooks EB, Greis KD, Haines K, Klein-Gitelman MS, Olson J, Onel K, O'Neil KM, Silverman ED. Initial validation of a novel protein biomarker panel for active pediatric lupus nephritis. *Pediatr. Res.* 2009; 65(5): 530-536.
 63. Mosley K, Tam FW, Edwards RJ, Crozier J, Pusey CD, Lightstone L. Urinary proteomic profiles distinguish between active and inactive lupus nephritis.

- Rheumatology (Oxford) 2006; 45(12):1497-1504.
64. Wu J, Chen Y, Gu W. Urinary proteomics as a novel tool for biomarker discovery in kidney diseases. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 2010 11(4): 227-237.
 65. Mok ChCh. Biomarkers for Lupus Nephritis: A Critical Appraisal. *J. Biomed. Biotech.* 2010, 11.
 66. Ogawa M, Hirawa N, Tsuchida T. Urinary excretions of lipocalin-type prostaglandin D2 synthase predict the development of proteinuria and renal injury in OLETF rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2005; 21: 924–934.
 67. Oda H, Shiina Y, Seiki K. Development and evaluation of a practical ELISA for human urinary lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Clin Chem.* 2002; 48: 1445–1453.
 68. Tsuchida T, Eguchi N, Eguchi Y. Lipocalin-type prostaglandin D synthase in urine in adriamycin-induced nephropathy of mice. *Nephrol Physiol.* 2004; 96: 42–51.
 69. Tesar V, Zima T. Recent progress in pathogenesis of nephrotic proteinuria. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008; 45: 139–220.
 70. Haraldsson B, Nystrom J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev.* 2008; 88: 451–487.
 71. Vilasi A, Cutillas PR, Maher AD. Combined proteomic and metabonomic studies in three genetic forms of the renal Fanconi syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 293: 456–467.
 72. Utsumi K, Itoh K, Kase R. Urinary excretion of the vitronectin receptor (integrin α V β 3) in patients with Fabry disease. *Clin Chem Acta.* 1999; 279: 55–68.
 73. Moran V, Obrador GT, Thandahi R. Fabry kidney disease. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2003; 14(1): 367–377.
 74. Ortiz A, Oliviera JP, Waldek S. Nephropathy in males and females with Fabry disease:

Cross-sectional description of patients before treatment with enzymereplacement therapy. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23: 1600–1607.

75. Moore D F, Krokhn OV, Beavis RC, Ries M, Robinson Ch, Goldin E, Brady RO, Wilkins JA, Schiffmann R. Proteomics of specific treatment-related alternations in Fabry Disease: A strategy to identify biological abnormalities. *PNAS*. 2007; 104 (8), 2873-2878.
76. Schiffmann R, Waldek S, Benigni A, Auray-Blais Ch. Biomarkers of Fabry Disease Nephropathy. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 2010; 5, 360-364.

12 Přílohy

Příloha 1

Vojtová L., Zima T., Tesař V., Kazderová M.: Study of Urinary Proteomes in Patients with Nephrotic Syndrome. *Folia Biologica*, 2007, 53: 58-65

Příloha 2

Vojtová L., Zima T., Tesař V., Michalová J., Příkryl P., Dostálová G. and Linhart A.: Study of urinary proteomes in Anderson-Fabry disease, *Renal Failure*, 2010, 32, (10): 1202–1209

Příloha 3

Vojtová L., Zima T., Tesař V., Michalová J., Příkryl P., Dostalová G., Linhart A.: Study of urinary proteomes in anderson-fabry disease. 34th FEBS Congress, Praha, 4.- 9.7. 2009. *FEBS Journal*, 2009, 276, Suppl. 1, OP 8,5-1, s. 84

Příloha 4

Vojtová L., Zima T., Tesař V., Kazderová M.: Study of urinary proteomes in patients with nephrotic syndrome by 2D technique, *Euromedlab Congress 2007*, Amsterdam, 3.-7. 6. 2007. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2007, 45, Special suppl., s S444

Příloha 5

Vojtová L., Zima T., Tesař V., Kazderová M.: Studium změn proteinů u onemocnění ledvin s nefrotickým syndromem, 31. Kongres České nefrologické společnosti, Hradec Králové, 22.-24. června 2006: *Aktuality v nefrologii*, 2006, Suppl. 1, s. 23

Příloha 6

Vojtová L., T. Zima, V. Tesař, M. Kazderová: Changes in the urinary proteomes in patients with nephrotic syndrome. Sborník abstrakt XX. Biochemický sjezd, Piešťany, 2006, s. 149

Příloha 7

Vojtová L.: Studium změn proteinů v moči 2D elektroforézou. Sborník abstrakt 6. SVK 1. LF UK, Praha, 2005, s. 27

Příloha 8

Vojtová L.: Studium změn proteinů u nefrotického syndromu, Sborník abstrakt 7. SVK 1. LF UK, Praha, 2006, s. 38

Příloha 9

Vojtová L.: Study of urinary proteomes in patients with nephrotic syndrome by 2D technique. Sborník abstrakt 8. SVK 1. LF UK, Praha, 2007, s. 31

12.1 Příloha 1

Vojtová L., Zima T., Tesař V., Kazderová M.: Study of Urinary Proteomes in Patients with Nephrotic Syndrome. *Folia Biologica*, 2007, 53: 58-65

Study of Urinary Proteomes in Patients with Nephrotic Syndrome

(urinary proteomes / nephrotic syndrome / two-dimensional electrophoresis)

L. VOJTOVÁ¹, T. ZIMA¹, V. TESARŤ², M. KAZDEROVÁ²

¹Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, ²Department of Nephrology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, and General Teaching Hospital, Prague, Czech Republic

Abstract. Heavy proteinuria may be caused by either increased glomerular basement membrane permeability or membrane or podocyte structural damage, and also by impairment of secretion-reabsorption tubular processes. The precise composition of modified or degraded urine proteins in proteinuria is not known. However, a possible toxic effect of proteins on tubular cells and disease progression is assumed. In this study, 15 patients with nephrotic proteinuria and other diagnoses (systemic lupus erythematoses with renal involvement (lupus nephritis) and AAV) were analysed by the 2D electrophoresis method. We have studied sample stability during storage, the albumin separation effect on sample analyses using ammonium sulphate, and the effect of proteases on the protein spectrum. In the first step, the proteins were divided by the isoelectric focusing method using polyacrylamide strips (pH 3–10 linear). The second step involved two-dimensional SDS electrophoresis performed in 12% polyacrylamide gel, which separated proteins according to their molecular weight. The proteins were visualized by the silver method. The gels were evaluated by Phoretix 2D expression software 2005. We found out that samples are stable for more than 6 months provided that they are frozen to –80°C. The separation of albumin caused higher lucidity of the urinary proteomes. Without adding protease inhibitors we could detect proteolysis with increased quantity of proteins manifested in the area of about 10 kDa and decreased quantity of proteins detectable in the area with molecular weights about 50 kDa.

Introduction

Proteinuria is a well-recognized negative prognostic factor for patients with kidney disease. The possible presence of proteases among various urinary proteins

should be stressed, as they may play an important role in degradation and changing structure and features of the filtered proteins. Ultimately the reabsorption by tubular cells may be affected. Common laboratory methods do not allow detection of changes in these urinary protein molecules. However, these changes of proteins may contribute to renal damage and its progression. Proteomic analysis (2D, LC-MS/MS, HPLC-MS/MS) provides many advantages compared with conventional methods such as Western blot analysis, because a large complement of expected and unexpected proteins can be examined simultaneously. Western blot analysis is limited by the relatively small number of proteins that can be studied in a single experiment and the availability of a specific antibody to the targeted protein is also necessary. However, HPLC coupled to tandem MS (HPLC-MS/MS) requires complicated instrumentation and MS analyses are required for all experiments. Construction of a urinary proteome map on 2D gel may therefore be a useful technique, because the recent methodology of 2D PAGE provides a consistent protein spot pattern (Thongboonkerd, 2004).

The presented data are focused on the study of urinary protein changes in glomerular renal diseases (predominantly with the nephrotic syndrome) using modern analytical techniques such as isoelectric focusing and two-dimensional (2D) electrophoresis in polyacrylamide gels. A similar technique of protein determination by 2D electrophoresis is being studied in other laboratories, which are focused on different types of diseases such as tubular renal disease (Fanconi syndrome) or various carcinomas (Cutillas et al., 2004; Pieper et al., 2004; Rossing et al., 2005).

Protein analysis using 2D electrophoresis gives a very clear picture about proteins contained in the sample. Earlier studies have shown that this technique is comfortable for protein analysis from animal sources (Gygi et al., 2000; Washburn et al., 2001; Pyo et al., 2004). We have focused on detailed urinary protein analysis (technique optimization, sample preparation, and protein stability) in patients with glomerulopathies accompanied mostly with nephrotic syndrome. Next, we studied the technique of albumin separation from the sample and the protease effect on protein changes in urine samples.

Received January 8, 2007. Accepted February 28, 2007.

This study was supported by research projects of the Ministry of Health of the Czech Republic No. 64165 and of the Grant Agency of Charles University No. 203434/54.

Corresponding author: Lucie Vojtová, Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General Teaching Hospital, Karlovo náměstí 32, 120 00 Prague 2, Czech Republic. Phone: +(420) 224 966 627; e-mail: lucie.vojtova@vfn.cz

Folia Biologica (Praha) 53, 58-65 (2007)

The main aim of this study was optimization of the two-dimensional (2D) technique in order to obtain a clear spectrum of proteins in the urine of patients with heavy proteinuria and identification of noticeable protein changes in urine in the presence of proteases.

Material and Methods

The following chemicals and instruments were used in the study:

- 2-DE ampholytes pH 3–10L (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden);
- BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen, Glasgow, Great Britain);
- Protease inhibitor cocktail (Sigma, Saint Louis, MO);
- IPG Strip pH 3–10L (Amersham Biosciences);
- electrophoresis Multiphor II (Amersham Biosciences);
- SDS-PAGE vertical electrophoresis (Scie-Plas, Warwickshire, Great Britain);
- mini vertical electrophoresis (Hoefler, San Francisco, CA);
- Power Supply EPS 3501 (Amersham Biosciences.);
- spectrophotometer Modular (Roche, Basel, Switzerland);
- dialysis membrane Visking, 10 kDa (Roth, Karlsruhe, Germany).

Solutions

The following solution were used:

- acetate buffer (50 mM acetate; 0.3 M NaCl; 6 mM EDTA; pH = 5.3)
- Ranford's assay solution (0.1 mM Coomassie brilliant blue G250; 5% (95% ethanol); 10% (85% H₃PO₄))
- Rehydration stock solution (Amersham Biosciences) – 2D electrophoresis
- Equilibration buffer solution (Amersham Biosciences) – 2D electrophoresis
- 30% acrylamide mixture (29% acrylamide; 1% N, N'-methylenebisacrylamide)
- TRIS-glycin solution for SDS electrophoresis (10x) (290 mM TRIS; 2.5 M glycine; 1% SDS)

Preparation of samples

Urinary samples from 15 patients with nephrotic proteinuria and other diagnoses (systemic lupus erythematoses with renal involvement (lupus nephritis) and ANCA-associated vasculitis (AAV)) were analysed. Their proteinuria varied between 0.97 and 10 g per day.

Thirty-ml samples from 24-h collection of urine were used for the analyses. Total protein concentration was determined using pyrogallol red (Modular). Urinary samples from patients with proteinuria less than 1 g were concentrated using Amicon Ultra (Millipore, Billerica, MA) (10 kDa, 5 min, 3000 x g, 4°C) (Joo et al., 2003). Samples were analysed immediately or sample aliquots were stored at –80 °C.

Stability of samples

Samples that were not analysed immediately were stored at –80 °C. Their stability was validated by repeated analyses after 30 and 180 days, respectively. Again, we used the centrifugation method described above where the quantity of proteins in the samples was lower than 1 g/24 h.

To test the stability of proteins, we studied five different samples of patients with the nephrotic syndrome. Protein spectra of samples analysed immediately after collection, 30 and 180 days after storage at –80 °C, were compared using software Phoretix 2D expression 2005.

Separation of albumin

Albumin was separated from samples containing albumin concentrations higher than 2.9 g/ 24 h using ammonium sulphate (Harlow and Lane, 1999). The amount of ammonium sulphate was added to the given volume of each of the five samples studied, so as to get 50% saturated solution. The samples were incubated and mixed at 4°C for 16 h. Exactly 50% saturation of the sample by ammonium sulphate causes protein agglutination and only albumin remains diluted in the solution. The mixture was next centrifuged (Amicon Ultra 10 kDa, 10 min, 10 000 x g, 4°C). The pellet containing all urine proteins except albumin was diluted in distilled water and transferred to the dialysis membrane (molecular mass cutoff at 10 kDa). The following dialysis against 1.5 M Tris buffer, pH = 7.5, removed the ammonium sulphate, which might disturb the subsequent detection of proteins. The protein concentration after removing albumin was determined by Bradford's assay. The samples prepared by this method were analysed immediately.

Effect of proteases

The presence of proteases was studied in samples from five patients with primary glomerulopathy (three of them with nephrotic syndrome) after 48-h incubation at 37 °C.

Three aliquots from each patient were prepared in this part of the study. Two identical 5-ml aliquots from each urine sample were separated immediately after collection. Forty µl of a cocktail containing protease inhibitors (serine, cysteine, aminopeptidase) and sodium azide were added to one aliquot of each sample. The second aliquot contained only sodium azide. These two aliquots were incubated 48 h at 37°C.

Another (third) aliquot obtained from each sample was frozen at –80°C immediately after the collection without adding any other substances.

All aliquots were analysed together at the same time.

Determination of protein concentration

Bradford assay

Bradford's spectrophotometric method (Bradford, 1976) was used to determine protein concentration and bovine albumin was used for calibration. The samples for analysis were prepared by mixing 200 µl of the sam-

ple with 2.5 ml of the Bradford reagent. The next step was 10 min incubation at room temperature (25°C) and absorption was monitored at 595 nm against a standard.

Method using pyrogallol red

We used the method described by Watanabe et al. (1986). After the collection of urine (1057 ml/24 h) the sample was diluted 10-fold using a solution containing 60 µl/l pyrogallol red, 40 µmol/l sodium molybdate and 50 nmol/l succinate, pH 2.3. Absorption was measured after 10-min incubation of the samples at 37°C using the spectrophotometric instrument Modular (Roche).

2D electrophoresis

The proteins were divided by the isoelectric focusing method (IEF) using 7-cm polyacrylamide strips with immobilized linear gradient pH 3–10 (IPG strip pH 3–10L, Amersham Biosciences). The total amount of protein placed on each polyacrylamide strip was 20 µg. Each strip was rehydrated overnight with a rehydration solution. The isoelectric focusing was performed in three steps to reach 3500 V. After completion of the IEF, the proteins on the strip were equilibrated with an equilibration buffer or the strip was frozen at –80°C for later use. The IPG strip was then transferred onto 12% polyacrylamide gel and the second dimensional separation

was performed in SE260 Mini-Vertical Electrophoresis Unit (Amersham Biosciences). The proteins were then visualized by the Silver Method (Silver Bullit Kit, Amresco, St. Louis, MO).

Gel comparison

The software Phoretix 2D expression 2005 was used for protein analysis. The patient's urine sample that was analysed immediately after collection was used as a reference gel. This reference gel was then used to compare proteins between investigated gels with or without added protease inhibitors. The protein content (in %) was calculated using the following formula:

$$\% \text{ protein: } [\text{total protein in the sample (with or without inhibitors)}/\text{total protein in the sample analysed immediately after collection}] \times 100$$

Results

Stability of samples

The nephrotic proteinuria samples were investigated. According to the definition of nephrotic syndrome, the protein content of urine in proteinuria is higher than 1 g.

It was therefore not necessary to concentrate urine samples before 2D analysis when silver detection is used for protein visualization. Two different urine samples from

patients with the nephrotic syndrome analysed on the first and 30th day after collection of samples are shown in Fig. 1. The study of the protein spectrum using software Phoretix 2D expression 2005 before and after 30 days of storage at –80 °C did not show protein changes in the sample. Even after 6-month storage of the sample, its reanalysis produced identical results (Fig. 1).

Separation of albumin

In some samples, albumin deteriorated the lucidity of the urinary proteomes. Therefore, albumin was removed from the samples by a method based on different protein solubility at a given concentration of salts. Two protein maps of patients' samples with proteinuria are shown in Fig. 2. The separation of albumin from sample (A) and (B) resulted in higher lucidity of the urinary proteomes and higher protein resolution in an area with molecular weight > 30 kDa. The lower amount of albumin in the sample is visible at a 1D electrophoreogram of three fractions, namely proteins before extraction of the albumin, supernatant after centrifugation, and urine proteins after separation of the albumin (see Fig. 3).

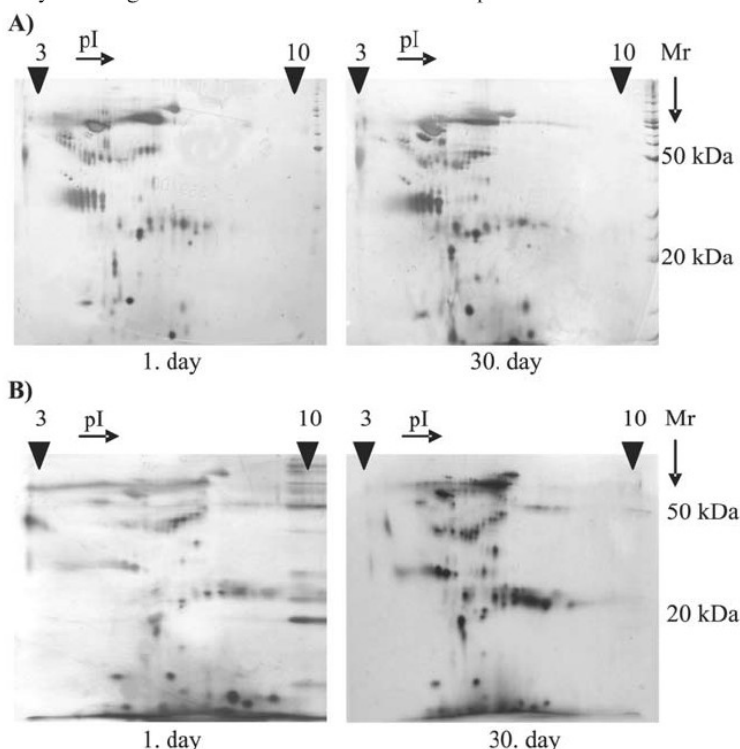


Fig. 1. Comparison of 2D electrophoreograms analysed in different intervals after sample collection. The urine samples were analysed immediately after collection using 7-cm polyacrylamide strips pH 3–10L by the IEF method, where 20 µg of total protein amount were loaded on each strip. The proteins were next separated by SDS-PAGE in 12% polyacrylamide gel and detected by silver.

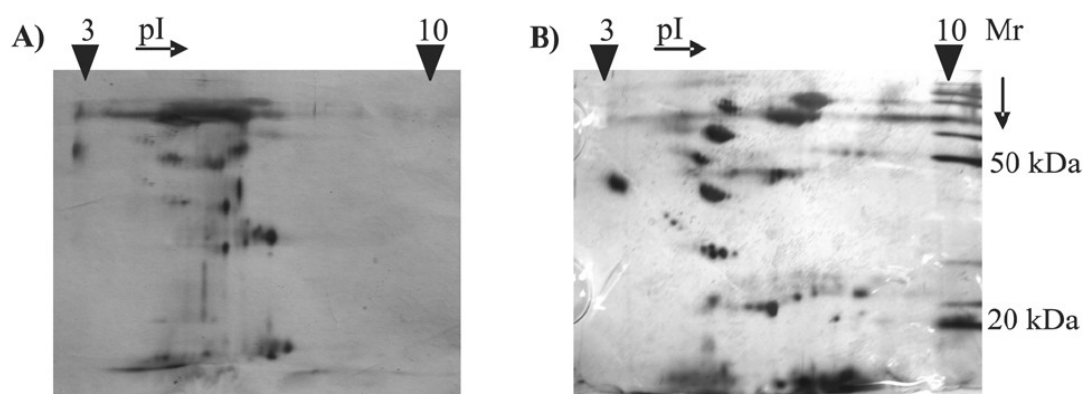


Fig. 2. Comparison of protein map before and after removal of albumin. The urine samples were analysed immediately after collection using 7 cm polyacrylamide strips pH 3–10L by the IEF method, where 20 μ g of total protein amount were loaded on each strip. The proteins were next separated by SDS-PAGE in 12% polyacrylamide gel and detected by silver. The protein spectrum of a patient with nephrotic syndrome before (A) and after (B) removal of albumin.

Effect of proteases

The quantity of enzymes (including proteases) in the urine in kidney disease increases due to damaged plasma filtration and may unfavourably affect protein analysis results. Figure 4 shows four different urine samples from patients with the nephrotic syndrome. The first three electrophoreograms (A, B, C) are focused on the total urinary protein spectrum comparison and the last one (D) is focused on the area of molecular weight higher than 30 kDa.

The study of protein spectra (urine samples from five different patients with primary glomerular disease) using software Phoretix 2D expression 2005 has con-

firmed important protein changes observable at two areas of molecular weight, i.e. range 50–100 kDa and 10–20 kDa (Fig. 4 – diagram marked in black). We could detect proteolysis in samples without adding any protease inhibitors, as manifested by the increased amounts of small proteins (about 10 kDa). On the other hand, a decrease of proteins was observable in the area with molecular weights about 50 kDa. Therefore, we focused on quantitative changes and found strong elevation and drop of the amount of the proteins in these molecular weight groups. The amount of proteins with the lowest molecular weight about 10 kDa in samples without addition of the inhibitors increased more than twice (Table 1 and Fig. 5).

Table 1. Average percentage changes of selected proteins observed using Phoretix 2D expression software version 2005. Samples were collected from five different patients.

Mol. w.	Protein	Sample with inhibitors (average %) ^a	Sample without inhibitors (average %) ^b	Probable mol. w.	Probable pI
>50 kDa	1	↓ 8 ± 1	↓ 13 ± 1	89	7
	2	↑ 23 ± 2	↓ 36 ± 2	64	5
	3	↑ 24 ± 2	↑ 114 ± 5	45	6.2
	4	↑ 6 ± 2	↑ 17 ± 1	48	5.1
>30 kDa	5	↑ 8 ± 1	↑ 28 ± 2	39	6.6
	6	↓ 10 ± 2	↓ 48 ± 3	33	6.3
	7	↑ 5 ± 1	↑ 15 ± 2	30	7
	8	↓ 4 ± 1	↓ 7 ± 1	32	5.5
	9	↑ 9 ± 2	↑ 38 ± 3	33	5.2
	10	↓ 13 ± 1	↓ 30 ± 2	27	5.6
10 kDa	11	↓ 11 ± 1	↑ 32 ± 2	15	5.9
	12	↑ 50 ± 2	↑ 256 ± 16	10	7

^a) N = 5: 100 – [(amount of protein in the sample with inhibitors / amount of protein in the sample analysed immediately after sample collection) × 100]

^b) N = 5: 100 – [(amount of protein in the sample without inhibitors / amount of protein in the sample analysed immediately after sample collection) × 100]



Fig. 3. SDS-PAGE in 12% polyacrylamide gel detected by silver: 1. standard; 2. urine proteins before albumin extraction; 3. supernatant containing albumin after centrifugation; 4. urine proteins after albumin extraction.

On the other hand, the proteins in the area of about 30–50 kDa increased and decreased with lesser contrast in both experiments (with or without inhibitors).

We found similar spectra of proteins in samples analysed immediately after the collection and analysed after incubation with protease inhibitors. This indicates that the effect of proteases can be bypassed either by immediate analysis or by proteolysis inhibition. On the other hand, proteases in the urine may induce marked changes in its protein spectra, namely increase of small molecules (proteins of about 10 kDa) and decrease of molecules with 50–100 kDa (Table 1, Figs. 4, 5).

We found out that samples are stable for more than 6 months provided that they are frozen to -80°C . The separation of albumin caused higher lucidity of the urinary proteomes. Without adding protease inhibitors we could detect proteolysis, with increased quantity of proteins manifested in the area of about 10 kDa and decreased quantity of proteins detectable in the area with molecular weights about 50 kDa.

Discussion

Increasing numbers of scientific laboratories specialize in the study of urine proteins using 2D electrophoresis (Nejedlý et al., 1986; Engliš, 1995; Rossing

et al., 2005) in order to get superior spectra for subsequent MALDI-TOF MS analysis and protein identification. The comparison of protein spectra among certain renal diseases, but also patients' protein maps before and after treatment, can lead to detection of biomarkers typical for a specific disease. As mentioned in the Introduction, insufficient kidney function may lead to a higher amount of proteases in the urine. These proteases may affect the true content and composition of proteins in the urine during analysis. The main aim of our study was the urine sample preparation and 2D technique optimization in order to reduce protein loss or change before analysis and to verify the effect of the proteases on patients' protein maps.

In most cases, the samples were treated immediately after collection to reduce protein loss due to other factors. Other samples were frozen at -80°C for later analysis. The sample stability during storage was confirmed by urine sample reanalysis 30 days after the first analysis. Protein spectrum analysis confirmed that freezing and subsequent storage did not affect the presence of proteins in urine samples. Earlier study of protein detection in urine using 2D electrophoresis called attention to the presence of interfering substances, which can negatively affect analysis using isoelectric focusing (Oh et al., 2004). We applied limited amounts of protein to the polyacrylamide strip and analysis was performed by silver detection to avoid these problems without using sample dialysis and subsequent lyophilization (Oh et al., 2004).

Albumin is the main protein in the serum, and therefore also in the urine. Its molecular weight is about 67 kDa. Besides this form, the patient's urine also contains its various fragments. As shown in Fig. 2, separation of albumin caused higher lucidity of the urinary proteomes and higher protein resolution in the area with molecular weight > 30 kDa. This fact was confirmed by 1D SDS-PAGE electrophoresis, where only albumin was contained in the supernatant fraction after centrifugation (Fig. 3). The ammonium sulphate protein precipitation is suitable for analysis of samples with lower protein content. In this case, the optimal concentration of this salt is 75% (Thonboonkerd et al., 2006). It is possible to separate the albumin from a sample using Affi-Gel Blue agarose kit from the BioRad Company (Oh et al., 2004), where the lucidity of the protein spectra was observed to be similar with our results. Another study (Ahmed et al., 2003) documented similar changes when albumin was isolated from serum samples. These methods do not eliminate those albumin fragments that might have a toxic effect on tubular cells. It was established (Jain et al., 2005) that albumin is not a specific indicator for diagnosis of renal damage. Albumin is common in urine in both healthy and diseased individuals (its amount in healthy subjects is very low). The removal of albumin from the samples does not hinder detection of potential markers for a given disease.

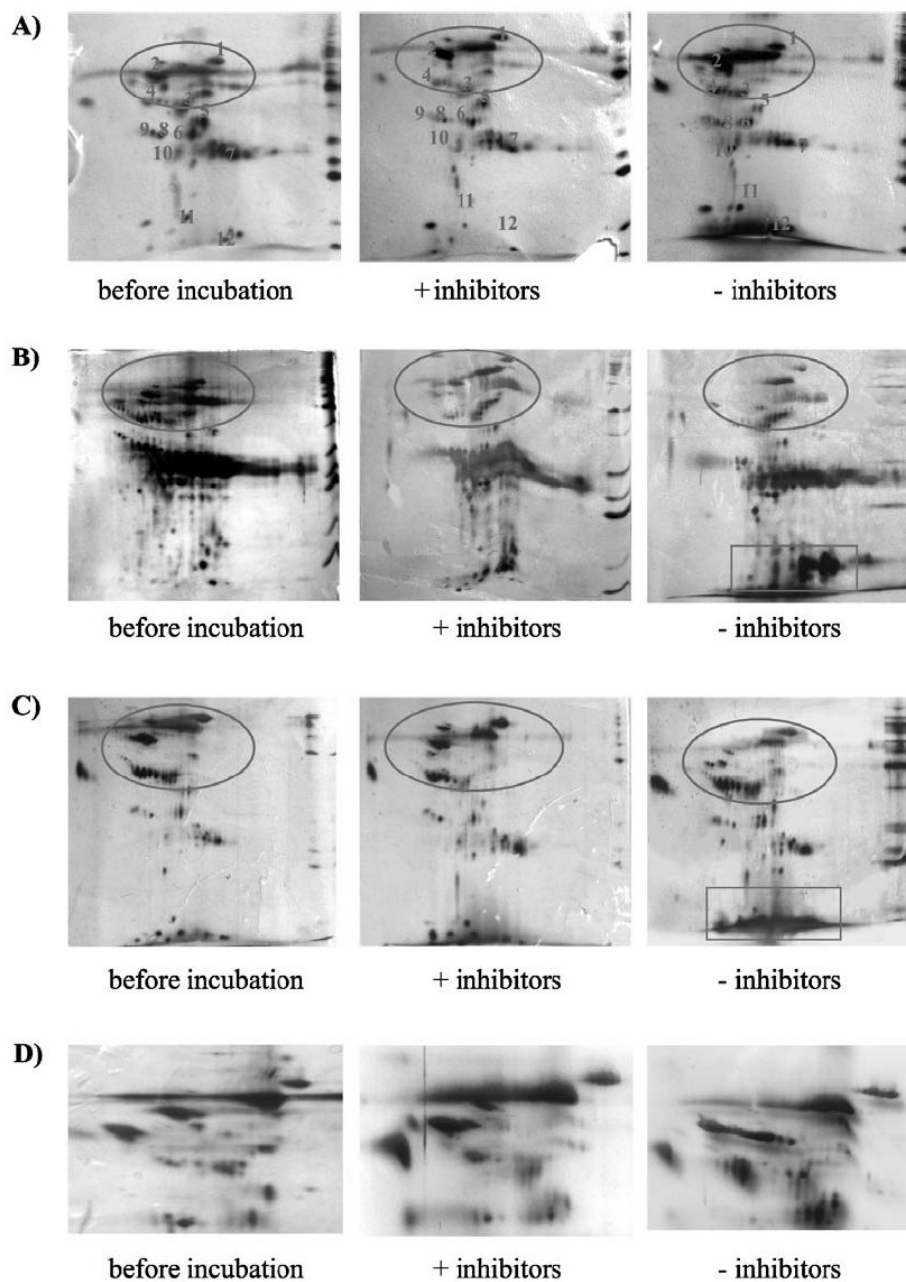


Fig. 4. Changes in the protein map in accordance to the presence of protease inhibitors in the samples of four different patients (A, B, C, D) with nephrotic syndrome. D) detailed comparison of protein map changed in the area of molecular weights higher than 30 kDa. Samples were analysed after incubation 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.

The occurrence of proteases and their protein degradation effects were confirmed by a study at physiological temperature 37°C for 48 h. When a cocktail of protease inhibitors was added to the samples, there were only slight changes of protein spectra compared

with samples analysed immediately after collection. On the other hand, a decrease in the quantity of a protein with molecular weight about 55 kDa (protein 2) was observed in all samples studied without addition of the inhibitors, which might be explained by the effect of

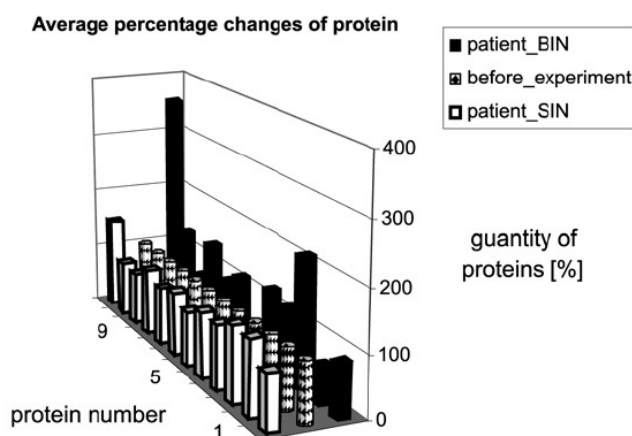


Fig. 5. Graphical demonstration of average changes in the protein content of samples collected from five different patients before 37°C incubation, after incubation with addition of inhibitors (SIN), and after incubation without addition of inhibitors (BIN).

proteases. On the contrary, the quantity of the same protein in samples with added inhibitors was increased. This could be explained by the thermal effect on proteins with higher molecular weights (e.g. albumin) due to the incubation at 37°C for 48 h. The temperature effect is not as noticeable as protein cleavage by the enzyme. Therefore, there is no such strong decomposition of proteins into smaller fragments. Their increased quantity is detectable only in the protein marked 2 compared to samples without inhibitors. This fact is especially seen in Fig. 4D. The incubation of samples without addition of the inhibitors caused more extensive protein changes in the area with molecular weight about 50 kDa. Increased proteolysis was visible in proteins with molecular weight lower than 20 kDa, especially in patient B, whose sample contained an unusually large quantity of proteins in the area with molecular weight about 30 kDa. Consequently, we can assume that degradation products occurred mainly in the area of about 10 kDa. This study implies that proteases have probably some effect on protein degradation in tubular processes and may be necessary for protein reabsorption by tubular cells. It is assumed that proteolytic activity may also occur at room temperature; however, it probably proceeds more slowly. It is therefore advisable to analyse the samples immediately or freeze them at -80°C, because the sample stability established in this way is at least one month. Finally, we should also mention the possibility of increased protease concentration in urine in patients with acute pancreatitis or cancer diseases, as confirmed by the studies of Sáez et al. (2005) or Botchkina et al. (2005), where concentrations of these enzymes were identified as diagnostic markers of the disease.

Conclusion

We optimized the 2D electrophoresis technique for samples of patients with the nephrotic syndrome and other primary glomerulopathies. We found that albumin separation by ammonium sulphate should be applied

when the albumin concentration in a sample is higher than 2.9 g/24 h. We assume that proteases probably play an important role in protein degradation in tubular processes. We focused on the groups of patients with renal disease with different types of heavy proteinuria. The study of urinary protein composition might contribute to the search for relatively specific markers of individual renal diseases and better explore their activity and severity than conventional proteinuria determination.

Acknowledgements

We are grateful to K. Pelinková, MSc. and A. Břichnáčová, MSc. from the Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics of the 1st Faculty of Medicine of Charles University and General Teaching Hospital for technical cooperation.

References

- Ahmed, N., Barker, G., Oliva, K., Garfin, D. Talmadge, K., Georgiou, H., Quinn, M., Rice, G. (2003) An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum. *Proteomics* **10**, 1980-1987.
- Botchkina, G. I., Kim, R. H., Botchkina, I. L., Kirshenbaum, A., Frischer, Z., Adler, H., L. (2005) Noninvasive detection of prostate cancer by quantitative analysis of telomerase activity. *Clin. Cancer Res.* **11**, 3243-3249.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Cutillas, P. R., Chalkley, R. J., Hansen, K. C., Cramer, R., Norden, A. G. W., Waterfield, M. D., Burlingame, A. L., Unwin, R. J. (2004) The urinary proteome in Fanconi syndrome implies specificity in the reabsorption of proteins by renal proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **287**, F353-F364.
- Engliš, M. (1995) *Proteinuria*. Stapro s.r.o., Pardubice (in Czech).
- Gygi, S. P., Corthals, G. L., Zhang, Y., Rochon, Y., Aebersold, R. (2000) Evaluation of two-dimensional gel electrophore-

- sis-based proteome analysis technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **17**, 9390-9395.
- Harlow E., Lane D. (1999) *Using Antibodies: a Laboratory Manual/Portable Protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Jain, S., Rajput, A., Kumar, Y., Uppuluti, N., Arvind, A. S., Tatu, U. (2005) Proteomic analysis of urinary protein markers for accurate prediction of diabetic kidney disorder. *J. Assoc. Physicians India* **53**, 513-520.
- Joo, W.-A., Lee, D.-Y., Kim, Ch.-W. (2003) Development of an effective sample preparation method for the proteome analysis of body fluids using 2-D gel electrophoresis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 1574-1577.
- Nejedlý, B., Tobiška, J., Zahradníček, L. (1986) *Basic and Morphological Urine Examinations*. Ministry of Health of the Czech Republic, Prague (in Czech).
- Oh, J., Pyo, O. J., Jo, E.-H., Hwang, S., Kang, S.-Ch., Jung, J.-H., Park, E.-K., Kim, S.-I., Chol, J.-Y., Lim, J. (2004) Establishment of a near-standard two-dimensional human urine proteomic map. *Proteomics* **4**, 3485-3497.
- Pieper, R., Gatlin, Ch. L., McGrath, A. M., Makusky, A. J., Mondal, M., Seonarain, M., Field, E., Schatz, C. R., Estovo, M. A., Ahmed, N., Anderson, N. G., Steiner, S. (2004) Characterization of the human urinary proteome: A method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics* **4**, 1159-1174.
- Rossing, K., Mischak, H., Parving, H.-H., Christensen, P. K., Walden, M., Hillmann, M., Kaiser, T. (2005) Impact of diabetic nephropathy and angiotensin II receptor blockade on urinary polypeptide patterns. *Kidney Inter.* **68**, 193-205.
- Sáez, J., Martínez, J., Trigo C., Sánchez-Payá, J., Company, L., Laveda, R., Grinó, P., García, C., Pérez-Mateo, M. (2005) Clinical value of rapid urine trypsinogen-2 test strip, urinary trypsinogen activation peptide, and serum and urinary activation peptide of carboxypeptidase B in acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* **11**, 7261-7265.
- Thongboonkerd, V. (2004) Proteomics in nephrology: current status and future directions. *Am. J. Nephrol.* **24**, 360-378.
- Thongboonkerd, V., Chutipongtanate, S., Kanlaya, R. (2006) Systematic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics: quantity, quality, and variability. *J. Proteom. Res.* **5**, 183-191.
- Washburn, M. P., Wolters, D., Yates, J. R. (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome via multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19**, 242-247.
- Watanabe, N., Kamei, S., Ohkubo, A., Yamanaka, M., Ohsawa, S., Makino, K., Tokuda, K. (1986) Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clin. Chem.* **32**, 1551-1554.

12.2 Příloha 2

Vojtová L., Zima T., Tesař V., Michalová J., Příkryl P., Dostálová G. and Linhart A.: Study of urinary proteomes in Anderson-Fabry disease, *Renal Failure*, 2010, 32, (10): 1202–1209

LABORATORY STUDY

Study of urinary proteomes in Anderson-Fabry disease

Lucie Vojtová,¹ Tomáš Zima,¹ Vladimír Tesař,² Jana Michalová,^{3,4}
Petr Příkryl,³ Gabriela Dostálová,⁵ and Aleš Linhart⁵

¹Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic, ²Department of Nephrology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic, ³Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic, ⁴Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic, ⁵Department of Internal Cardiovascular Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

Abstract

Background: Anderson-Fabry disease (AFD) is an X-linked genetic disorder with deficient α -galactosidase A activity. The main aim of this work was to investigate possible differences in urine proteins between healthy controls and AFD patients and to identify abnormal proteins as potential biomarkers of disease. **Material and methods:** We studied 2D electrophoresis images of urine samples collected from AFD patients and healthy subjects. The proteins were separated using isoelectric focusing method followed by SDS-PAGE. The proteins were then visualized by silver staining and characterized by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Results:** We found out that the urinary spectra of all the Fabry disease samples included identical proteins with molecular weight around 20–40 kDa. The concentration of some proteins was more than three times higher in the AFD samples, compared to the controls. The abundant proteins were identified by MALDI-TOF MS and included the following: alpha-1-antitrypsin, alpha-1-microglobulin, prostaglandin H2 D-isomerase, complement-c1q tumor necrosis factor-related protein, and Ig kappa chain V-III. Possible glycosylation at Asn51 and Asn78 sites of the prostaglandin H2 D-isomerase was detected. **Conclusions:** AFD urinary proteomics revealed increased secretion of several proteins. We postulate that the observed difference in the amount of prostaglandin H2 D-isomerase and its position on two-dimensional gels might be related to different glycosylation in AFD subjects.

Keywords: Anderson-Fabry disease, MALDI-TOF MS, two-dimensional electrophoresis, urinary proteomes

INTRODUCTION

Anderson-Fabry disease (AFD) is an X-linked glycolipid storage disorder that is caused by deficient activity of the lysosomal enzyme α -galactosidase A (α -gal A).^{1,2} Globotriaosylceramide (Gb₃), the glycolipid substrate for this enzyme, progressively accumulates within vulnerable cells and tissues of affected patients, which leads to a wide clinical spectrum of clinical manifestations. Endothelial, perithelial, and smooth muscle cells of the vascular system, renal epithelial cells, myocardial cells, dorsal root ganglia, and cells of the autonomic nervous system are selectively damaged by Gb₃.^{3–5} The diagnosis of AFD is usually established by detection of low α -gal A activity in

plasma, leukocytes, or fibroblasts, or by detection of increased Gb₃ levels in urine kidney, skin, and heart, or by detection of gene mutations.⁶ The activity of α -gal A in hemizygous Fabry disease patients is hardly detectable, whereas in milder disease variants (cardiac), in atypical hemizygous patients, and in female carriers, the residual activity of α -gal A is detectable with variable intensity.⁴

The incidence of AFD is estimated to be 1:40,000,^{7,8} in some studies up to 1:3500.⁸ As in other X-linked recessive disorders, symptoms in carriers are expected to be rare; however, in AFD, up to 80% of female carriers suffer from some typical disease symptoms and up to 20% of these women present with

Address correspondence to Lucie Vojtová, Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Karlovo náměstí 32, 120 00 Prague 2, Czech Republic. Tel.: +420 224 966627; fax: +420 224 966668; E-mail: lucie.vojtova@vfn.cz

Received 21 June 2010; accepted 16 August 2010

health-endangering symptoms. The classical AFD phenotypes suffer from a multiorgan disorder affecting blood vessels, kidneys, heart, and the central and peripheral nervous system. The clinical onset of the disease typically occurs during childhood or adolescence, with symptoms of recurrent episodes of severe pain in extremities. Vital organs are progressively affected with increasing age in hemizygous males with death, resulting from renal, cardiac, or cerebrovascular complications, usually occurring during the fourth or the fifth decade of life.⁹ Enzyme replacement therapy (ERT) with human recombinant α -gal A has become available since 2001.^{10,11} Recent evidence suggests that the ERT is more efficacious if started early, before the development of advanced kidney involvement with overt proteinuria.^{7,12} Until now, assessment of Gb₃ excretion and its concentration in plasma and urine has been used as a biomarker to monitor the disease response to the treatment. Recently, lyso-Gb₃ has been suggested as a more promising tool. Lyso-Gb₃ is a soluble compound, in contrast to Gb₃, that can easily move in and out of cells. It lacks a hydrophobic (acyl) fragment compared to Gb₃. Lyso-Gb₃ is virtually not detectable in plasma obtained from normal individuals, but relatively high concentrations occur in samples from Fabry males. Also in the case of symptomatic Fabry females, increased levels of lyso-Gb₃ were detected.¹³ However, there is a critical need to find new biomarkers for assessment of the disease severity and the ERT efficacy.¹⁴ Our study was designed to analyze potential differences in urinary proteomes between AFD patients and healthy controls, using modern analytical techniques, such as isoelectric focusing and two-dimensional (2D) electrophoresis in polyacrylamide gels. Employment of a similar technique of protein determination by 2D electrophoresis was shown in previous studies,^{15–18} in which some protein differences specific to certain diagnoses (nephrotic syndrome, Fanconi syndrome, or various carcinomas) were detected.

The main aim of this work was to establish the differences between the healthy controls and the AFD subjects and to identify potential disease-specific proteins using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). We expect this finding to facilitate better understanding of the AFD.

MATERIAL AND METHODS

Study population

Urinary samples from 20 patients with AFD (11 males, 9 females, age range 18–69 years) were collected. Their proteinuria varied between 0.1 and 1 g/24 h; 13 patients were on ERT (nine of them were given agalsidase beta (Fabrazyme[®]) 1 mg/kg every other week, four of them were given agalsidase alfa (Replagal[®]) 0.2 mg/kg every

other week) and 7 subjects received no therapy. Physiologic proteinuria is usually estimated to be between 30 and 50 mg/day and is mostly composed of tubular proteins, namely uromodulin (Tamm–Horsfall protein). Proteinuria of 150 mg/day may be accepted as an upper limit of “normal” proteinuria. So our patients had only small proteinuria, which would be tagged as normal and could be determined using the routine laboratory evaluation (Table 1). The control group consisted of 10 healthy individuals (five males and five females aged between 27 and 42 years of age). Samples (30 mL) from their 24-h urine collections were used for the analyses. Proteinuria is usually very low (up to 1 g/24 h) in patients with Fabry disease; therefore, most of the urine samples (proteinuria of less than 1 g/24 h) had to be concentrated (10 kDa, 5 min, 3000 × g, 4°C)¹⁹ using Amicon Ultra (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) before their 2D analysis. The samples were either analyzed immediately, or the sample aliquots were stored at –80°C. Stability of the urine samples during their storage was confirmed by urine sample reanalysis 30 and 180 days after the first analysis. The protein spectrum analysis confirmed that freezing and subsequent storage did not affect the presence of proteins in the urine samples.¹⁵ The study was approved by a local ethical committee (Table 1).

Determination of protein concentration

The Bradford spectrophotometric method²⁰ was used to determine protein concentration in urine in concentrated samples. Absorption was monitored at 595 nm against a standard. Then, a method described by Watanabe²¹ using pyrogallol red was used to determine a total protein concentration at the beginning of the analyses. Absorption was measured by the Modular spectrophotometric instrument (Roche, Basel, Switzerland).

2D electrophoresis

The proteins were separated by the isoelectric focusing method using 7 cm polyacrylamide strips with immobilized linear gradient, pH 3–10 (IPG strip pH 3–10 L, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden; electrophoresis Multiphor II, Amersham Biosciences). The total amount of protein placed on each polyacrylamide strip was 20 µg. The isoelectric focusing was performed in three steps to reach 3500 V (Power Supply EPS 3501, Amersham Biosciences). The second dimensional separation was performed in the SE260 Mini-Vertical Electrophoresis Unit (Scie-Plas, Warwickshire, UK) in the 12% polyacrylamide gel. The proteins were then visualized by silver staining (Silver Bullit Kit, Amresco, St. Louis, Missouri, USA).

Gel comparison

The Phoretix 2D expression 2005 software was used for the protein analysis. A urine sample from a healthy

Table 1. Clinical data of Anderson-Fabry disease patients.

Patient number	Patient age	Gender	Mutation GAL, genotype	Mainz score	Alphagal leukocyte (nmol/mg h)	ERT	Therapy from	Drug	DM	ACE inhib, AT block.	S_creatinin (μmol/L)	U_creatinin (mmol/L)	HD	Transplantation	Proteinuria (g/L)
1	57	F	N215S	19	30.3	N			N	Y	53	11.5	N	N	<0.07
2	60	F	N215S	20	27.8	N			N	N	76	8.40	N	N	<0.07
3	69	F	c.674del59	27	23.6	Y	12/2001	Fabrazyme	N	Y	77	11.10	N	N	0.14
4	39	F	R342Q	14	28.6	N			N	N	78	1.6	N	N	<0.07
5	60	F	R342Q	15	8.5	Y	11/2004	Replagal	N	Y	85	18.3	N	N	0.17
6	46	F	delEx2	19	25.4	N			N	N	78	13.7	N	N	<0.07
7	55	F	R342Q	7	17.9	Y	12/204	Replagal	N	Y	57	18.6	N	N	0.13
8	64	F	I317T	38	22.3	N			N	Y	73	6.8	N	N	0.08
9	61	F	R342Q	54	21	N			Y	Y	93	4.3	N	N	0.09
10	40	M	c.674del59	38	0.7	Y	12/2004	Replagal	N	N	75	5.6	N	N (nephrectomy 2006)	0.18
11	32	M	c.674del59	14	0.7	Y	12/2003	Replagal	N	N	67	6.9	N	N	0.08
12	43	M	c.674del59	31	0.3	Y	12/2003	Fabrazyme	N	N	82	9.5	N	N	0.1
13	42	M	delEx2	22	2.5	Y	1/2004	Fabrazyme	N	N	73	10.5	N	N	0.14
14	40	M	R342Q	25	1.6	Y	2/2004	Fabrazyme	N	N	75	7.7	N	N	0.08
15	18	M	c.674del59	16	0.2	N	2007	Fabrazyme	N	N	69	3.3	N	N	<0.07
16	52	M	delEx2	34	0.22	Y	1/2004	Fabrazyme	N	Y	71	9.5	N	N	0.24
17	59	M	c.674del59	51	2.6	Y	7/2001	Fabrazyme	N	N	185	2.4	N	N	0.37
18	55	M	L294X	32	0.4	Y	11/2004	Fabrazyme	N	Y	645	6.3	Y	Y (1984, HD started from 2005)	0.61
19	51	M	R342Q	47	1.0	Y	11/2004	Fabrazyme	N	Y	218	6.1	Y	Y (HD started in 2001, next transpl. 2006)	0.38
20	48	M	c.674del59	34	1.82	Y	2/2004	Fabrazyme	N	Y	122	6.2	N	N	0.66

Note: DM, diabetes mellitus; ERT, enzyme replacement therapy; HD, hemodialysis; ACE, inhibitors of angiotensin-converting enzyme; AT, blocker of angiotensin receptor; Y, yes; N, no; F, female; M, male.

control was used as a reference gel. This reference gel was then used to compare the proteins in the investigation gels from the AFD patients with those from the healthy controls. The protein content increase (in percentage) was calculated using the following formula:

$$\% \text{ increase protein: } [\text{total protein in the sample (Fabry disease)}/\text{total protein in the sample (healthy control)}] \times 100$$

In-gel protein digestion

The silver-stained protein spots were excised from the 2D gels, cut into small pieces, and washed several times with fresh 1:1 solution of 30 mM potassium ferricyanide and 100 mM sodium thiosulfate. Upon complete destaining, the gel pieces were washed with water, dehydrated in acetonitrile (ACN), and again rehydrated in water. The supernatant was removed and the gel was partly dried in a vacuum concentrator. The gel pieces were then reconstituted in a cleavage buffer containing 0.01% 2-mercaptoethanol, 0.1 M 4-ethylmorpholine acetate, 1 mM CaCl₂, 10% ACN, and sequencing grade modified trypsin (50 ng/mL, Promega, Fitchburg, Wisconsin). After overnight digestion, the resulting peptides were extracted with 40% ACN/0.5% trifluoroacetic acid (TFA). For the low-abundance proteins, the peptides were purified and concentrated prior to mass spectrometric analysis according to manufacturer's user guide using ZipTip tips with 0.6 μ L C18 resin (Millipore, Billerica, Massachusetts).

MALDI-TOF MS and protein identification

Ten milligrams per milliliter solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) in 30% ACN/30% MeOH water solution containing 0.2% TFA was used as a MALDI matrix. A sample (1 mL) was placed on the polished steel MALDI target plate, allowed to air-dry at room temperature, and then 1 mL of the matrix solution was added. Positive ion mass spectra were obtained using a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) mass spectrometer (Autoflex II, Bruker Daltonik) in reflectron mode, equipped with a 337 nm nitrogen laser. The generated spectra were within the mass range of 700–4500 Da. The data were calibrated against the Peptide calibration standard I (Bruker Daltonik) as an external calibration standard, using a seven-point calibration. Mass spectrometric sequencing of selected peptides was done by MALDI LIFT-TOF/TOF MS of the same prepared samples with the above instrument operated in MS/MS mode. Using the FlexAnalysis 2.4 program with the SNAP peak detection algorithm, peak lists in the XML data format were created. Statistical calibration was included in the program and no further adjustments were applied; the maximum number of assigned peaks was set to 50. After the peak

labeling, all known contaminant signals were manually removed. The peak lists were examined against Swiss-Prot or NCBI nr database subsets of human proteins, using the MASCOT search engine with the following search criteria settings: peptide tolerance of 100 ppm, the number of allowed missed cleavage sites was set to 1, fixed modifications of cysteine carbamidomethylation, and variable methionine oxidation. No restriction criteria were set with respect to protein molecular weight and pI values. Identity of a particular candidate protein was confirmed by MS/MS peptide sequencing, when either the probability-based Mowse score was only slightly higher than the threshold value calculated for the parameters used or the sequence coverage was too low.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a Student's *t*-test, the *p*-values of <0.05 being considered significant.²²

RESULTS

Changes in proteins

Twenty urine samples collected from AFD patients were analyzed in this study. Two examples of electrophoretograms are shown in Figure 1. Urinary spectra of all the AFD samples included identical proteins, most of them with molecular weight around 20–40 kDa (Figure 1).

There was no significant difference in the distribution of proteins on electrophoretograms in AFD patients undergoing ERT, compared to those without therapy or healthy controls (Figure 1). No α -gal A activity was detected in the urine samples examined. α -gal A activity was measured as published.²³

Quantitative analysis revealed significantly increased amount of some proteins with molecular weights about 30 kDa in AFD patients. This finding was then confirmed by software Phoretix 2D expression 2005. We picked out three proteins, the quantities of which were significantly higher in the AFD subjects, compared to the healthy controls; in the AFD samples, the levels of prostaglandin H2 D-isomerase and complement-c1q tumor necrosis factor-related protein were three times higher and the Ig kappa chain V-III levels were more than five times higher, compared to the controls (Table 2, Figure 2).

Characterization of proteins

Some AFD proteins also included differentially expressed spots. These were then excised and subjected to in-gel tryptic digestion and identification by MALDI-TOF MS. In cases when the sequence coverage was too low, identity of the protein candidate was confirmed by MS/MS peptide sequencing. The abundant proteins in the gels were characterized as alpha-1-antitrypsin, alpha-1-microglobulin,

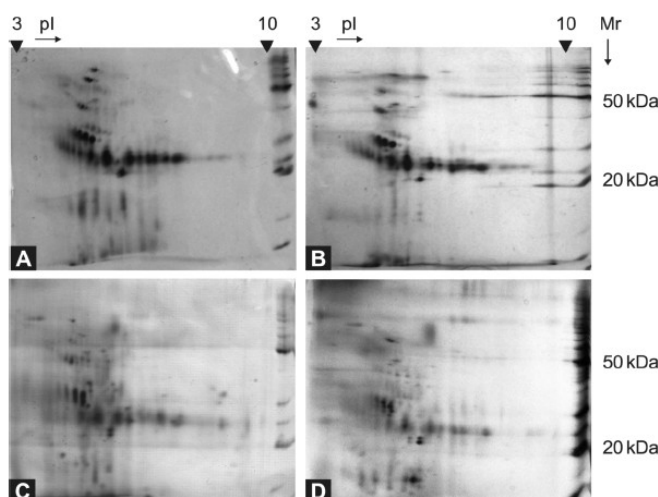


Figure 1. Comparison of 2D electrophoregrams of urine samples collected from patients with Fabry disease (A, B) and healthy controls (C, D). The urine samples were analyzed immediately after their collection and short-time centrifugation, using 7 cm polyacrylamide strips, pH 3–10 L, and SDS-PAGE. BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen, Glasgow, UK) was used as a molecular mass marker.

Table 2. Changes of selected proteins observed using Phoretix 2D expression software version 2005.

No.	Protein	Anderson-Fabry disease (average \pm SD) % ^a	Expected molecular weight (kDa)	Expected pI
1	Prostaglandin H2 D-isomerase	398 \pm 25*	28	6.1
2	Complement-c1q tumor necrosis factor-related protein	289 \pm 17*	23	5.8
3	Ig kappa chain V-III	591 \pm 7*	27	5.5

Note: * $p < 0.05$ versus healthy controls. Samples were collected from 20 different patients with Anderson-Fabry disease. ^a $N = 20$: [(amount of protein in the sample with Anderson-Fabry disease/amount of protein in healthy control) \times 100].

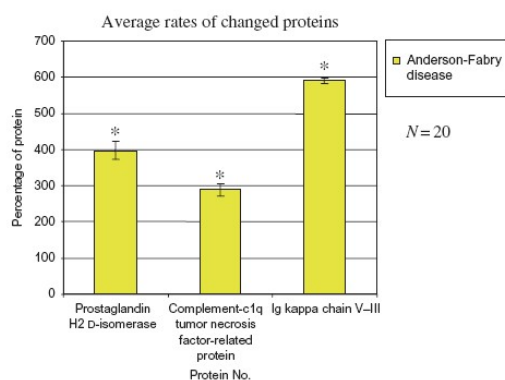


Figure 2. Changes in the protein amount in the samples collected from 20 patients with Fabry disease compared with those in healthy controls. * $p < 0.05$ versus healthy controls.

prostaglandin H2 D-isomerase, complement-c1q tumor necrosis factor-related protein, Ig kappa chain V-III (Figure 3). Positions of all the proteins identified on 2D gels were compared with their theoretical isoelectric points and molecular sizes (Table 3). Most of the proteins were in the expected range, except prostaglandin H2 D-isomerase. This exception may be caused by glycosylation at Asn51 and Asn78 sites.

DISCUSSION

Two-dimensional electrophoresis followed by MALDI-TOF MS is a powerful tool for studying protein changes and for their identification. The main aim of most clinical studies using this technique is to identify possible biomarkers typical for specific diseases. In our previous study,¹⁵ lucid spectra of proteins were investigated in patients with nephrotic proteinuria and other diagnoses, such as systemic lupus erythematosus with renal involvement (lupus

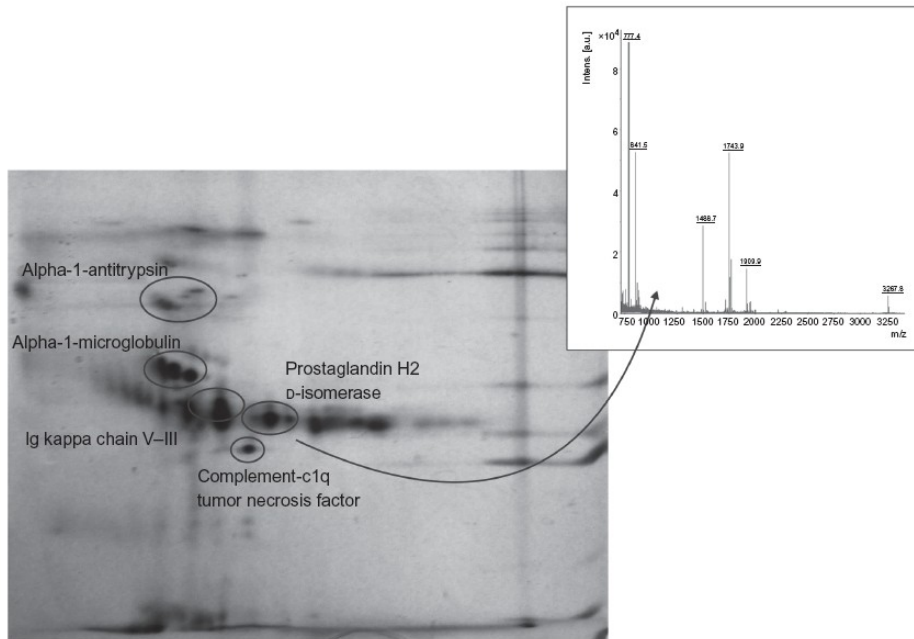


Figure 3. A representative 2D gel image of the Fabry disease proteome, depicting all identified proteins. All urine samples were analyzed immediately after their collection using 7 cm polyacrylamide strips, pH 3–10 L, and SDS-PAGE.

Table 3. Comparison of experimental and theoretical molecular size and isoelectric point of identified proteins by MALDI-TOF MS.

No.	Protein	Experimental <i>pI</i>	Theoretical <i>pI</i>	Experimental molecular weight	Theoretical molecular weight
1	Alpha-1-antitrypsin	5.1	5.4	48	47
2	Alpha-1-antitrypsin	4.9	5.4	47	47
3	Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor	5.2	5.9	40	40
4	Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor	5.1	5.9	40	40
5	Ig kappa chain V-III	5.5	5.8	27	23
6	Complement-c1q tumor necrosis factor-related protein	5.8	6.1	23	25
7	Prostaglandin H2 D-isomerase	6.1	7.7*	28	21*

Note: **p* < 0.05 experimental versus theoretical parameter, *N* = 20.

nephritis) and anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. The main aim of our study was to analyze the composition or structure of proteins in urine samples in AFD patients, compared to that in normal subjects. No significant differences in the number of spots were detected between the healthy controls and the AFD patients; therefore, we may conclude that the disease does not lead to any formation of new proteins or degradation products. This conclusion can also be confirmed by comparison of the spectra obtained from AFD patients with the protein spectra obtained from nephrotic patients, in whom the protein quantity on the gel is substantially higher than in healthy volunteers.

Although qualitative changes were not detected, quantitative differences in protein contents were noted. We hypothesize that the increased quantity of proteins in urine is caused by the disease, because AFD is usually associated with impairment of proximal tubular function. This proximal tubular function impairment results in a failure to reabsorb a variety of filtered substances, particularly low-molecular-weight proteins. Most of the identified proteins were of plasma origin and, under normal conditions, would be reabsorbed in the proximal tubule via receptor-mediated endocytosis. On the other hand, analysis of quantitative changes revealed substantially increased

Ig kappa chain V-III, complement-c1q tumor necrosis factor-related protein, and prostaglandin H2 D-isomerase. The first two protein levels were more than three times higher and the prostaglandin H2 D-isomerase level was five times higher than the respective values in the control subjects. The latter protein plays an important role in the regulation of phospholipid metabolism⁶ and its excretion is significantly increased in patients with chronic renal failure.^{24–26} The higher quantity of these three proteins could result from their increased synthesis or from increased glomerular basement membrane permeability.^{27,28} Impairment of secretion–reabsorption tubular processes because of lysosomal vacuoles affecting the renal tubular system appears to be the most likely cause, as the composition of the proteins, identified in the AFD subjects, appears to be very similar to a proteome found in patients with tubular proteinuria.^{6,29} Other changes in protein excretion were reported in a histochemical study³⁰ showing that urinary excretion of integrin β_3 originating from the vitronectin receptor was significantly increased in the AFD group, compared to a healthy control group.

Finally, the abundant proteins identified on 2D gels were subjected to MALDI-TOF MS analysis. All seven studied proteins (alpha-1-antitrypsin, alpha-1-microglobulin, prostaglandin H2 D-isomerase, complement-c1q tumor necrosis factor-related protein, Ig kappa chain V-III) were also found to be present in healthy individuals. Except for H2 D-isomerase, positions of all the other proteins on 2D gels corresponded to their theoretical isoelectric points and molecular sizes. We assumed that modifications such as glycosylation of H2 D-isomerase at Asn51 and Asn78 sites might have occurred, which could result in a change in molecular size of the enzyme and its isoelectric point. The glycosylation changes at the protein sites are of potential relevance and might serve as potential biomarkers. However, this presumption should be confirmed by future studies analyzing the relationship between the above findings and the disease severity and progression. Most of the articles published last year were focused on clinical studies of various types of therapy of the Fabry disease patients,³¹ studies in patients prior to their ERT initiation,³² or in patients treated with α -gal A (a glycoprotein of molecular size 101 kDa with a homodimeric structure) infusions, aimed at reducing the Gb₃ storage in tissues.¹¹

CONCLUSION

Our proteomic analysis revealed no significant qualitative differences between the urine samples collected from the treated and untreated AFD subjects and the samples collected from the control subjects. However, quantity of several proteins was substantially different in the AFD group and the control group. In

addition, the molecular size of H2 D-isomerase was shown to be modified. These findings should be confirmed by future studies analyzing the relevance of the observed changes for prediction of the disease severity and outcomes.

Acknowledgments

The authors are grateful to K. Pelinková, MSc, and A. Břichnáčová, MSc, from the Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine of Charles University and General Teaching Hospital, for technical cooperation. This study was supported by research project of the Ministry of Health of the Czech Republic (No. 64165), the Grant Agency of Charles University (No. 203434/54), and by grants of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM 0021620806 and LC 06044).

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- Beck M, Ricci R, Widmer U, et al. Fabry disease: Overall effects of agalsidase alfa treatment. *Eur J Clin Invest.* 2004;34:838–844.
- Mehta A, Ricci R, Widmer U, et al. Fabry disease defined: Baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *Eur J Clin Invest.* 2004;34:236–242.
- Elleder M. Sequelae of storage in Fabry disease – pathology and comparison with other lysosomal storage diseases. *Acta Paediatr Suppl.* 2003;92:46–53.
- Linhart A, Paleček T, Bultas J, et al. New insights in cardiac structural changes in patients with Fabry's disease. *Am Heart J.* 2000;139:1101–1108.
- Linhart A, Elliott PM. The heart in Anderson-Fabry disease and other lysosomal storage disorders. *Heart.* 2007;93:528–535.
- Tesar V, Zima T, Kalousová M. Pathobiochemistry of nephrotic syndrome. *Adv Clin Chem.* 2003;37:173–218.
- Schiffmann R, Murray GJ, Treco D, et al. Infusion of α -galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:365–370.
- Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, et al. High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet.* 2006;79:31–40.
- MecDermot J, Holmes A, Miners A. Anderson-Fabry disease: Clinical manifestations in a cohort of 60 obligate carrier females. *J Med Genet.* 2001;38:769–775.
- Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, et al. Safety and efficacy of recombinant human α -galactosidase A-replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med.* 2001;345:9–16.
- Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: A randomized controlled trial. *J Am Med Assoc.* 2001;285:2743–2749.
- Banikazemi M, Bultas J, Waldek S, et al. Agalsidase-beta therapy for advanced Fabry disease: A randomized trial. *Ann Intern Med.* 2007;146:77–86.
- Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(8):2812–2817.

- [14] Schiffmann R, Waldek S, Benigni A, Auray-Blais Ch. Biomarkers of Fabry disease nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(2):360–364.
- [15] Vojtová L, Zima T, Tesař V, Kazderová M. Study of urinary proteomes in patients with nephrotic syndrome. *Folia Biol (Praha)*. 2007;53(2):58–65.
- [16] Cutillas PR, Chalkley RJ, Hansen KC, 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:F353–F364.
- [17] Pieper R, Gatlin ChL, McGrath AM. Characterization of the human urinary proteome A method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics*. 2004;4:1159–1174.
- [18] Rossing K, Mischak H, Parving H-H. Impact of diabetic nephropathy and angiotensin II receptor blockade on urinary polypeptide patterns. *Kidney Int*. 2005;68:193–205.
- [19] Joo W-A, Lee D-Y, Kim Ch-W. Development of an effective sample preparation method for the proteome analysis of body fluids using 2-D gel electrophoresis. *Biosci Biotechnol Bioc hem*. 2003;67:1574–1577.
- [20] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248.
- [21] Watanabe N, Kamei S, Ohkubo A. Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clin Chem*. 1986;32:1551–1554.
- [22] Kleinbaum DG, Kupper CL, Muller KF. *Applied Regression Analysis and Other Multivariable Methods*. Boston: PWS-Kent; 1988.
- [23] Dean KJ, Sung SS, Sweeley CC. The identification of alpha-galactosidase B from human liver as an alpha-N-acetylgalactosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1977;77(4):1411–1417.
- [24] Ogawa M, Hirawa N, Tsuchida T. Urinary excretions of lipocalin-type prostaglandin D2 synthase predict the development of proteinuria and renal injury in OLETF rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;21:924–934.
- [25] Oda H, Shiina Y, Seiki K. Development and evaluation of a practical ELISA for human urinary lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Clin Chem*. 2002;48:1445–1453.
- [26] Tsuchida T, Eguchi N, Eguchi Y. Lipocalin-type prostaglandin D synthase in urine in adriamycin-induced nephropathy of mice. *Nephrol Physiol*. 2004;96:42–51.
- [27] Tesař V, Zima T. Recent progress in pathogenesis of nephrotic proteinuria. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2008;45:139–220.
- [28] Haraldsson B, Nystrom J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev*. 2008;88:451–487.
- [29] Vilasi A, Cutillas PR, Maher AD. Combined proteomic and metabolomic studies in three genetic forms of the renal Fanconi syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293:456–467.
- [30] Utsumi K, Itoh K, Kase R. Urinary excretion of the vitronectin receptor (integrin $\alpha_V\beta_3$) in patients with Fabry disease. *Clin Chem Acta*. 1999;279:55–68.
- [31] Moran V, Obrador GT, Thandahi R. Fabry kidney disease. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2003;14(1):367–377.
- [32] Ortiz A, Oliviera JP, Waldek S. Nephropathy in males and females with Fabry disease: Cross-sectional description of patients before treatment with enzymereplacement therapy. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:1600–1607.

12.3 Příloha 3

Vojtová L., Zima T., Tesař V., Michalová J., Příkryl P., Dostalová G., Linhart A.: Study of urinary proteomes in anderson-fabry disease. 34th FEBS Congress, Praha, 4.- 9.7. 2009.

FEBS Journal, 2009, 276, Suppl. 1, OP 8,5-1, s. 84

OP 8.5–1**Study of urinary proteomes in anderson-fabry disease**

L. Vojtova¹, T. Zima¹, V. Tesar², J. Michalova³, P. Prikryl³,
G. Dostalova⁴ and A. Linhart⁴

¹*Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Charles University in Prague First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital in Prague, Prague, CZECH REPUBLIC,* ²*Department of Nephrology, Charles University in Prague First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital in Prague, Prague, CZECH REPUBLIC,* ³*Charles University in Prague First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital in Prague, Institute of Pathological Physiology and Center of Experimental Hematology, Prague, CZECH REPUBLIC,* ⁴*2nd Department of Internal Cardiovascular Medicine, Charles University in Prague First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital in Prague, Prague, CZECH REPUBLIC*

Background: Anderson–Fabry disease (AFD), an X-linked genetic disorder with deficient α -galactosidase A activity, is characterized by kidney disease and kidney failure, particularly in affected hemizygous men. The main aim of this work was to analyze differences between healthy controls and AFD patients and to identify abnormal proteins using MALDI-TOF mass spectrometry (MS) as possible biomarkers of disease.

Material and methods: We studied 2D electrophoreograms of samples from AFD patients and healthy individuals. The proteins were separated by the isoelectric focusing method (IEF). The second dimensional separation was performed using SDS-PAGE. The proteins were then visualized by the Silver Method. Separated proteins were characterized by MALDI-TOF MS.

Results: We found that the urinary spectra of all samples with Fabry disease included identical proteins with molecular weight around 20–40 kDa. There was no significant difference in number of spots on the electrophoreograms from patients with Fabry disease compared with healthy donors. However some proteins in AFD patients' samples were increased more than three times. Abundant proteins were characterized by MALDI-TOF MS included alpha-1-antitrypsin, alpha-1-microglobulin, prostaglandin H2 D-isomerase, complement – c1q tumor necrosis factor-related protein, and Ig kappa chain V-III. Possible glycosylation of Asn51 and Asn78 could occur in prostaglandin H2 D-isomerase.

Conclusions: AFD urinary proteomics revealed an increased secretion of several proteins. The difference in the amount and position of H2 D-isomerase could be due to different glycosylation in AFD and should be studied as a potential biomarker of the disease.

12.4 Příloha 4

Vojtová L., Zima T., Tesař V., Kazderová M.: Study of urinary proteomes in patients with nephrotic syndrome by 2D technique, Euromedlab Congress 2007, Amsterdam, 3.-7. 6. 2007. Clin. Chem. Lab. Med., 2007, 45, Special suppl., s S444

W353**STUDY OF URINARY PROTEOMES IN PATIENTS WITH NEPHROTIC SYNDROME BY 2D TECHNIQUE**

L. Vojtová¹, T. Zima¹, V. Tesař² and M. Kazderová²

¹Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics,

²Department of Nephrology, General University Hospital and First Faculty of Medicine Charles University in Prague, Czech Republic

E-mail: lucie.vojtova@vfn.cz

Background. The urinary protein in healthy people does not exceed 150 mg/day and its increase above 250 mg/day indicates kidney damage. Proteinuria higher than 3.5 g/24h is typical for the nephrotic syndrome, usually indicating severe primary or secondary glomerular damage and also plays roles in progression of renal diseases. Thirty urine samples of patients with nephrotic syndrome and other diagnoses were analyzed by 2D electrophoresis method. The study was focused on 2D technique optimization, comparison of the urinary proteomes and on identification of the specific proteins.

Methods. The proteins were divided by isoelectric focusing method using polyacrylamide strips (pH 3-10 linear). The second dimensional SDS electrophoresis was performed in 12% polyacrylamide gel. The proteins were visualized by silver method and selected proteins were identified by MALDI-TOF MS.

Results. We found out that without adding protease inhibitors we can detect proteolysis, with increased quantity of proteins manifested in the area about 10 kDa and decreased quantity of proteins detectable in the area with molecular weights about 50 kDa. We evaluated that protease inhibitors (serine, cysteine, aminopeptidase) block the changes of urinary proteins and samples are then suitable for 2D electrophoresis and following proteomic analysis. The urinary maps comparison brought out that there are significant proteins' changes, which are typical for Fabry's disease and other nephropathies. Also albumin, transferrin, alpha-1 antitrypsin and transthyretin precursor were identified by MALDI-TOF MS.

Conclusions. Changes of urinary proteins should be important for renal diagnosis and progression.

Study of urinary proteomes in patients with nephrotic syndrome by 2D technique

L. Vojtová¹, T. Zima¹, V. Tesar², M. Kazderová²

¹Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics

²Department of Nephrology, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General Teaching Hospital

Background. The urinary protein in healthy people does not exceed 150 mg/day and its increase above 250 mg/day indicates kidney damage. Proteinuria higher than 3.5 g/24h is typical for the nephrotic syndrome, usually indicating severe primary or secondary glomerular damage and also plays roles in progression of renal diseases. Fifty urine samples of patients with nephrotic proteinuria and other diagnoses were analyzed by 2D electrophoresis method. Their proteinuria varied between 0,97-10 g per day. The study was focused on 2D technique optimization, comparison of the urinary proteomes and on identification of the specific proteins.

Methods. Thirty-ml samples from 24-h collection of urine were used for the analyses. Total protein concentration was determined using pyrogallol red. The proteins were divided by isoelectric focusing method using 7-cm polyacrylamide strips (pH 3-10 linear). The total amount of protein placed on each strip was 20 µg. The second dimensional SDS electrophoresis was performed in 12 % polyacrylamide gel. The proteins were visualized by silver method and proteins' spectrums were analyzed using Phoretix 2D expression software. Selected proteins were identified by MALDI-TOF MS.

RESULTS

Separation of albumin



Fig. 1. SDS-PAGE in 12% polyacrylamide gel detected by silver:
1. standard
2. urine proteins before albumin extraction
3. supernatant containing albumin after centrifugation
4. urine proteins after albumin extraction.

Albumin was separated from samples containing albumin concentrations higher than 2.9 g/24h using ammonium sulphate (Harlow and Lane, 1999).

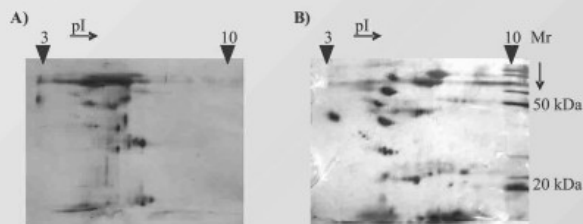


Fig. 2. Comparison of protein map before and after removal of albumin. The five urine samples were analysed immediately after collection using 7 cm polyacrylamide strips pH 3–10L by the IEF method, where 20 µg of total protein amount were loaded on each strip. The proteins were next separated by SDS-PAGE in 12% polyacrylamide gel and detected by silver. The protein spectrum of a patient with nephrotic syndrome before (A) and after (B) removal of albumin.

Effect of proteases

The presence of proteases was studied in samples from five patients with primary glomerulopathy (four of them with nephrotic syndrome) after 48-h incubation at 37 °C.

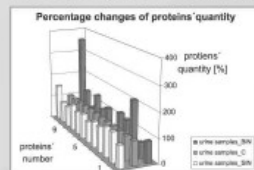


Fig. 3. Graphical demonstration of average changes in the protein content of samples collected from five different patients before 37°C incubation, after incubation with addition of inhibitors (SIN), and after incubation without addition of inhibitors (B(IN)).

Conclusion

We found out that albumin's separation caused the higher lucidity of the urinary proteomes and higher proteins resolution in area with molecular weight > 30 kDa and also that without adding protease inhibitors we can detect proteolysis, with increased quantity of proteins manifested in the area about 10 kDa and decreased quantity of proteins detectable in the area with molecular weights about 50 kDa. We evaluated that protease inhibitors (serine, cysteine, aminopeptidase) block the changes of urinary proteins and samples are then suitable for 2D electrophoresis and following proteomic analysis. The urinary maps comparison brought out that there are significant proteins' changes, which are typical for Fabry's disease and other nephropathies. Also albumin, transferrin, alpha-1 antitrypsin and transthyretin precursor were identified by MALDI-TOF MS.

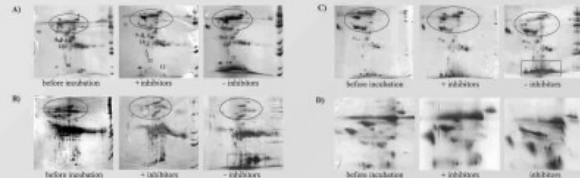


Fig. 4. Changes in the protein map in accordance to the presence of protease inhibitors in the samples of four different patients (A, B, C, D) with nephrotic syndrome. D) detailed comparison of protein map changed in the area of molecular weights higher than 30 kDa. Samples were analysed after incubation 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.

Comparison of urinary maps

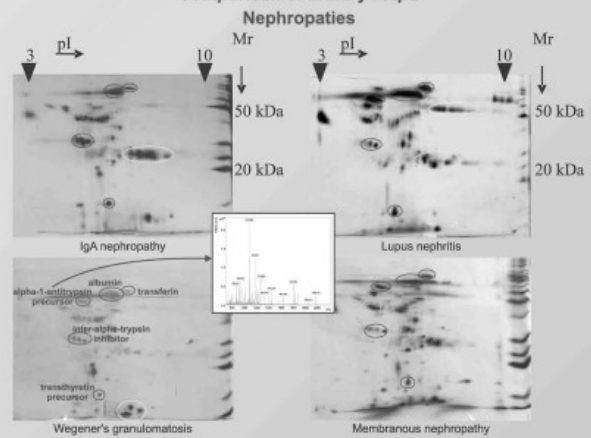


Fig. 5 Comparison of protein maps. The ten urine samples from patients with specific disease (IgA nephropathy, Lupus nephritis, Wegener's granulomatosis, Membranous nephropathy) were analysed immediately after collection using 7 cm polyacrylamide strips pH 3–10L by the IEF method, where 20 µg of total protein amount were loaded on each strip. The proteins were next separated by SDS-PAGE in 12% polyacrylamide gel and detected by silver. The proteins identified by MALDI-TOF MS are marked in red and the groups of proteins, which are characteristic for specific diseases are marked in yellow.

Fabry disease

The urinary spectra of all fifteen samples from patients with Fabry disease included identical proteins with molecular weight between 20–40 kDa.

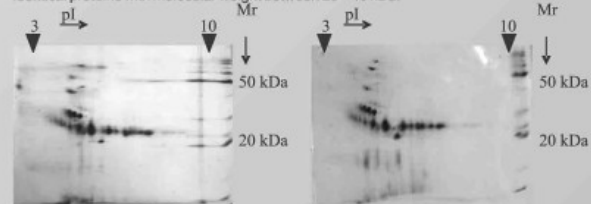


Fig. 6 Comparison of urinary proteomes from patients with Fabry disease. Fifteen samples were analysed immediately after collection using 7 cm polyacrylamide strips pH 3–10L by the IEF method, where 20 µg of total protein amount were loaded on each strip. The proteins were next separated by SDS-PAGE in 12% polyacrylamide gel and detected by silver.

References:

Harlow E., Lane D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual / Portable Protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Acknowledgement:

This study was supported by research projects of the Ministry of Health of the Czech Republic No. 64165 and of the Grant Agency of Charles University No. 203434/54.

12.5 Příloha 5

Vojtová L., Zima T., Tesař V., Kazderová M.: Studium změn proteinů u onemocnění ledvin s nefrotickým syndromem, 31. Kongres České nefrologické společnosti, Hradec Králové, 22.-24. června 2006: Aktuality v nefrologii, 2006, Suppl. 1, s. 23

Číslo prezentace: O-20

STUDIUM ZMĚN PROTEINŮ U ONEMOCNĚNÍ LEDVIN S NEFROTICKÝM SYNDROMEM

L. Vojtová¹, T. Zima¹, V. Tesař², M. Kazderová²

¹) ÚKBLD 1. LF UK a VFN, Praha 2

²) Klinika nefrologie 1. LF UK a VFN, Praha 2

Proteinurie je způsobena zvýšenou permeabilitou glomerulární bazální membrány, poškozením membrány, podocytů a narušením sekrečně-reabsorpčních tubulárních pochodů. U proteinurii není dosud známo přesné složení modifikovaných či degradovaných proteinů v moči, ale předpokládá se jejich možný toxický vliv na tubulární buňky a progresi onemocnění. Analyzovali jsme proteiny v moči u pacientů s nefrotickým syndromem metodou 2D elektroforézy. Dále jsme studovali vliv odstranění albuminu na analýzu vzorku a účinek proteáz v moči. Vyšetřili jsme 20 vzorků moče pacientů s nefrotickým syndromem a jinými nefropatiemi (amyloidóza AL, Wegenerova granulomatóza).

Proteiny jsou nejprve děleny na základě svých izoelektrických bodů metodou izoelektrické fokusace na polyakrylamidových stripech s imobilizovaným lineárním gradientem pH 3–10 a následně jsou separovány SDS elektroforézou ve 12% polyakrylamidovém gelu podle molekulové hmotnosti. Vizualizace proteinů je prováděna stříbrem.

Odstraněním albuminu se zvýší přehlednost celého spektra a zvýrazní se rozlišení proteinů v oblasti > 30 kDa. Porovnáním jednotlivých proteinových map sledovaných vzorků moči je patrné, že bez přítomnosti inhibitorů proteáz dochází k výrazné proteolýze projevující se zvýšeným množstvím proteinů v oblasti 10 kDa a naopak úbytkem proteinů v oblasti 50 kDa.

Byla optimalizována metoda 2D elektroforézy pro vzorky pacientů s nefrotickým syndromem. Zjistili jsme, že metoda odstranění albuminu síranem amonným zlepšila přehlednost proteinových spekter a že proteázy pravděpodobně hrají svou úlohu při degradaci proteinů při tubulárních pochodech.

12.6 Příloha 6

Vojtová L., Zima T., Tesař V., Kazderová M.: Changes in the urinary proteomes in patients with nephrotic syndrome. Sborník abstrakt XX. Biochemický sjezd, Piešťany, 2006, s. 149

L 2.2

CHANGES IN THE URINARY PROTEOMES IN PATIENTS WITH NEPHROTIC SYNDROM

Lucie Vojtová¹, Tomáš Zima¹, Vladimír Tesar², Markéta Kazderová²

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

²Klinika nefrologie 1. LF UK a VFN v Praze, Praha 2

Heavy proteinuria is caused by increased glomerular basement membrane permeability and membrane or podocytes damage. There isn't known an accurate composition of modified or degraded urine proteins in proteinuria. However, it is assumed possible proteins' toxic effect on tubular cells and disease progression. In this study, forty urine samples of patients with nephrotic syndrome and other nephropathy (amyloidose AL, Wegener-granulomatose, membranous nephropathy) were analyzed by 2D electrophoresis method. We have studied the albumin's separation effect on samples analyze. The study was also focused on comparison of the urinary proteomes and on finding the specific diagnosis proteins.

In the first step, the proteins were devided by isoelectric focusing method using polyacrylamide strips (pH 3-10 linear). The second dimensional SDS electrophoresis was performed in 12 % polyacrylamide gel, which separate proteins according to their molecular weight. The proteins were visualized by silver method. The gels were evaluated by Phoretix 2D expression software.

Albumin's separation caused the higher lucidity of the urinary proteomes and higher proteins resolution in area with molecular weight > 30 kDa. The urinary maps comparison brought out that there are some proteins' changes, which are typical for specific disease.

The 2D electrophoresis for patients' samples with nephrotic syndrom was optimized. We found out that albumin's separation by ammonium sulfate caused the higher lucidity of proteins spectrum and that some proteins could be diagnostic important. *This study is supported by MZ ČR VFN č. 64165 and GA UK č. 203434/54.*

12.7 Příloha 7

Vojtová L.: Studium změn proteinů v moči 2D elektroforézou. Sborník abstrakt 6. SVK 1. LF

UK, Praha, 2005, s. 27

STUDIUM ZMĚN PROTEINŮ V MOČI 2D ELEKTROFORÉZOU

Autor: Ing. Lucie Vojtová

Školitel: Prof. Tomáš Zima DrSc., MBA, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Proteinurii nacházíme u řady onemocnění ledvin a je často spojena s nefrotickým syndromem. Nefrotický syndrom je klinicko-laboratorní syndrom charakterizovaný velkou proteinurií, hypoproteinémií, edémy, hypercholesterolémií a lipidurií. Proteinurie je způsobena zvýšenou permeabilitou glomerulární bazální membrány (změna náboje membrány), poškozením membrány, podocytů a narušením sekrečně-reabsorbčních tubulárních pochodů. U proteinurií není dosud známo přesné složení modifikovaných či degradovaných proteinů v moči, ale předpokládá se jejich možný toxický vliv na tubulární buňky a progresi onemocnění. Práce je zaměřena na studium změn proteinů v souvislosti s nefrotickým syndromem a jeho možným ovlivněním terapií pomocí moderních analytických technik.

V současné době jsme zavedli techniku 2D elektroforézy. Proteiny jsou nejprve děleny na základě izoelektrických bodů metodou izoelektrické fokusace s využitím komerčně připravených 7 cm polyakrylamidových stripů s imobilizovaným lineárním gradientem pH 3–10. Následně jsou separovány SDS-elektroforezou v polyakrylamidovém gelu podle molekulové hmotnosti. Vizualizace rozdělených proteinů je prováděna stříbrem nebo coomassie blue.

Pro účely analýzy proteinů v moči je na základě našich výsledků vhodná metoda izoelektrické fokusace s celkovým počtem 124 kVh a SDS elektroforezy v 12% homogenním polyakrylamidovém gelu. Celkové množství proteinů nanášené na strip je 50 µg. Ve vybraných vzorcích jsme našli zajímavé rozdíly u proteinurie do 5 g/l, kde se vyskytují proteiny o molekulové hmotnosti 12 kDa a hodnotě izoelektrického bodu 9, které však u proteinurií do 10 g/l nenalézáme.

Byla zavedena a optimalizována metoda 2-D elektroforezy proteinů v moči a předběžné výsledky svědčí pro rozdíly spektra proteinů při různě závažné proteinurii. Vybrané izolované proteiny budou dále identifikovány pomocí MALDI-TOF MS ve spolupráci s FPBT VŠCHT.

12.8 Příloha 8

Vojtová L: Studium změn proteinů u nefrotického syndromu, Sborník abstrakt 7. SVK 1. LF

UK, Praha, 2006, s. 38

STUDIUM ZMĚN PROTEINŮ U NEFROTICKÉHO SYNDROMU

Autorka: Ing. Lucie Vojtová, 2. r. PGS

Školitel: prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Proteinurie je způsobena zvýšenou permeabilitou glomerulární bazální membrány, poškozením membrány, podocytů a narušením sekrečně-reabsorbčních tubulárních pochodů. U proteinurií není dosud známo přesné složení modifikovaných či degradovaných proteinů v moči, ale předpokládá se jejich možný toxický vliv na tubulární buňky a progresi onemocnění. Analyzovali jsme proteiny v moči u pacientů s nefrotickým syndromem metodou 2D elektroforesy. Dále jsme studovali vliv odstranění albuminu na analýzu vzorku a účinek proteas v moči. Vyšetřili jsme 20 vzorků moče pacientů s nefrotickým syndromem a jinými nefropatiemi (amyloidosa AL, Wegenerova granulomatosa).

K odstranění albuminu u vzorků, kde je koncentrace albuminu vyšší jak 2 g/l, byla využita metoda srážení síranem amonným. Proteiny jsou poté děleny na základě svých isoelektrických bodů metodou isoelektrické fokusace na polyakrylamidových stripech s imobilizovaným lineárním gradientem pH 3-10 a následně jsou separovány SDS elektroforesou v 12 % polyakrylamidovém gelu podle molekulové hmotnosti. Vizualizace proteinů je prováděna stříbrem a k hodnocení elektroforeogramu je používán program Phoretix 2D expression verze 2005.

Odstraněním albuminu se zvýší přehlednost celého spektra a zvýrazní se rozlišení proteinů v oblasti > 30 kDa. Porovnáním jednotlivých proteinových map sledovaných vzorků moči je patrné, že bez přítomnosti inhibitorů proteas dochází k výrazné proteolýze projevující se zvýšeným množstvím proteinů v oblasti 10 kDa a naopak úbytkem proteinů v oblasti 50 kDa.

Byla optimalizována metoda 2D elektroforesy pro vzorky pacientů s nefrotickým syndromem. Zjistili jsme, že metoda odstranění albuminu síranem amonným zlepšila přehlednost proteinového spektra a že proteasy pravděpodobně hrají svou úlohu při degradaci proteinů při tubulárních pochodech.

12.9 Příloha 9

Vojtová L.: Study of urinary proteomes in patients with nephrotic syndrome by 2D technique. Sborník abstrakt 8. SVK 1. LF UK, Praha, 2007, s. 31

**STUDY OF URINARY PROTEOMES IN PATIENTS WITH NEPHROTIC SYNDROME BY 2D TECHNIQUE****Author:** Lucie Vojtová, 3. roč.**Supervisor:** prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Background. The urinary protein in healthy people does not exceed 150 mg/day and its increase above 250 mg/day indicates kidney damage. Proteinuria higher than 3,5 g/ 24h is typical for the nephrotic syndrome, usually indicating severe primary or secondary glomerular damage and also plays roles in progression of renal diseases. Thirty urine samples of patients with nephrotic syndrome and other diagnoses were analyzed by 2D electrophoresis method. The study was focused on 2D technique optimization, comparison of the urinary proteomes and on identification of the specific proteins.

Methods. The proteins were divided by isoelectric focusing method using polyacrylamide strips (pH 3-10 linear). The second dimensional SDS electrophoresis was performed in 12 % polyacrylamide gel. The proteins were visualized by silver method and selected proteins were identified by MALDI-TOF MS.

Results. We found out that without adding protease inhibitors we can detect proteolysis, with increased quantity of proteins manifested in the area about 10 kDa and decreased quantity of proteins detectable in the area with molecular weights about 50 kDa. We evaluated that protease inhibitors (serine, cysteine, aminopeptidase) block the changes of urinary proteins and samples are then suitable for 2D electrophoresis and following proteomic analysis. The urinary maps comparison brought out that there are significant proteins' changes, which are typical for Fabry's disease and other nephropathies. Also albumin, transferrin, alpha-1 antitrypsin and transthyretin precursor were identified by MALDI-TOF MS.

Conclusions. Changes of urinary proteins should be important for renal diagnosis and progression.