

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Identifikace proteinů v moči laboratorních potkanů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Michaela Balášová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok:	2016

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 28. 4. 2016

.....

Poděkování

Děkuji svému školiteli, panu profesoru Marku Šebelovi, za čas, který mi věnoval, poskytnuté rady a obstarání vzorků pro experimenty. Děkuji také panu doktoru Renému Lenobelovi za změření vzorků na přístroji ESI-Q-TOF a dále všem pracovníkům Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum za vstřícný a přátelský přístup a rady, které mi pomohly při řešení experimentální části této práce. Závěrem bych ráda poděkovala své rodině za podporu během celého studia.

Tato práce byla podpořena projektem Studentské grantové soutěže IGA_PřF_2015_026.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Michaela Balášová
Název práce	Identifikace proteinů v moči laboratorních potkanů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

Studium močového proteomu může přinášet informace o normální fyziologii i patologii onemocnění. Pro úspěšnou analýzu proteinů v moči je důležitý výběr vhodné metody pro zkoncentrování a separaci proteinů před hmotnostně spektrometrickou (MS) analýzou. Zvýšená aktivita renálního sympatického nervového systému přispívá k patogenezi hypertenze. Definitivní orgánově specifickou léčbou hypertenze je renální denervace (RD). Doposud bylo publikováno mnoho studií, které prokazují snížení krevního tlaku po zákroku RD, ale nebyly v této souvislosti zkoumány změny močového proteomu. V této práci byly izolovány proteiny z moči laboratorních potkanů acetonovou precipitací. Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodesylsírany sodného byla zvolena jako metoda vhodnější pro separaci proteinů než isoelektrická fokusace. Pro štěpení proteinů v gelu byl trypsin upřednostněn před endoproteasou Glu-C. Celkem bylo v této práci identifikováno 201 proteinů tandemovou MS s ionizací pomocí matrice a analyzátozem doby letu (MALDI-TOF/TOF) nebo tandemovou MS s ionizací elektrosprejem kvadrupólovým analyzátozem a analyzátozem doby letu (ESI-Q-TOF). Ve vzorku moči odebraném jeden týden a jeden měsíc po RD, bylo identifikováno 16 respektive 4 proteiny, které nebyly identifikovány ve vzorcích před RD nebo po falešné RD. Některé z těchto proteinů byly v dříve publikovaných pracích označeny jako možné markerové proteiny chronického poškození ledvin nebo ledvinové ischemie.

Klíčová slova	Moč, močový proteom, renální denervace, příprava vzorku, hmotnostní spektrometrie.
Počet stran	85
Počet příloh	4
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Michaela Balášová
Title	Identification of proteins in rat urine
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
The year of presentation	2016

Abstract

Studying urinary proteome provides information about normal physiology as well as disease pathology. The selection of an appropriate method to concentrate and separate proteins before identification by mass spectrometry (MS) is crucial for a successful analysis. An increased renal sympathetic nerve activity contributes to the pathogenesis of hypertension. Renal denervation (RD) is a definite-organ-specific therapy of hypertension. Many studies demonstrating a reduction in blood pressure values after a surgical RD have been published, but the effect of the surgery on urine proteome has not previously been reported. In this work proteins were isolated from urine of laboratory rats by acetone precipitation. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis was chosen for protein separation as a more appropriate method than isoelectric focusing. Trypsin was more suitable proteolytic enzyme for in-gel digestion of proteins than endoproteinase Glu-C. A total of 201 proteins were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight tandem MS (MALDI-TOF/TOF) or electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem MS (ESI-Q-TOF). There were 16 and 4 proteins identified in samples collected one week and one month after RD respectively, which were not identified in any sample before RD or after sham RD. Some of these proteins have been considered as potential candidate biomarkers of chronic kidney disease or renal ischemia in previous studies.

Keywords	Urine, urinary proteomics, renal denervation, sample preparation, mass spectrometry.
Number of pages	85
Number of appendices	4
Language	Czech

Obsah

1 ÚVOD	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1 Močový systém	10
2.1.1 Stavba ledviny	10
2.1.1.1 Cévní zásobení a inervace ledviny	11
2.1.1.2 Stavba nefronu	13
2.1.2 Funkce ledviny	15
2.1.2.1 Regulace glomerulární filtrace	15
2.1.2.2 Regulace tubulárních procesů	16
2.1.3 Centrální mechanismy řízení funkce ledvin.....	17
2.1.3.1 Sympatický nervový systém	17
2.1.3.2 Angiotensin II	19
2.1.3.3 Aldosteron	20
2.1.3.4 Antidiuretický hormon	20
2.1.3.5 Atriální natriuretický peptid a prostaglandiny	21
2.2 Proteiny v moči - proteinurie	22
2.2.1 Patologická proteinurie	23
2.2.2 Diagnostika proteinů v moči	24
2.3 Identifikace v proteomice.....	25
2.3.1 Strategie analýzy	25
2.3.2 Separace v proteomice	27
2.3.2.1 Metody využívající separaci v gelu.....	27
2.3.2.2 Metody bez separace v gelu	28
2.3.3 Hmotnostní spektrometrie v proteomice	30
2.3.4 Identifikace biomarkerů metodami hmotnostní spektrometrie	32
2.4 Identifikace proteinů v moči	33
2.4.1 Moč jako zdroj markerových proteinů	33
2.4.2 Analýza močového proteomu	34
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
3.1 Materiál a metody	36
3.1.1 Použité chemikálie	36
3.1.2 Použité přístroje a pomůcky.....	36
3.1.3 Biologický materiál	37
3.1.4 Metody	37
3.1.4.1 Dialýza moči	37

3.1.4.2 Srážení proteinů z moči.....	38
3.1.4.3 Příprava vzorků pro SDS-PAGE a provedení separace	38
3.1.4.4 Příprava vzorků pro denaturační IEF a provedení separace.....	38
3.1.4.5 Příprava vzorků pro nativní IEF a provedení separace	39
3.1.4.6 Štěpení proteinů v gelu a extrakce peptidů	40
3.1.4.7 Odsolení peptidových vzorků	40
3.1.4.8 Separace peptidů nanoLC a MALDI-TOF/TOF analýza.....	40
3.1.4.9 Separace peptidů nanoLC a ESI-Q-TOF analýza	42
3.1.4.10 Zpracování dat.....	43
3.1.4.11 Vyhodnocení dat	43
4 VÝSLEDKY	44
4.1 Výběr vhodné metody pro separaci proteinů	44
4.2 Výběr vhodné proteasy pro štěpení proteinů	45
4.3 Analýza vzorků moči prvního odběru.....	47
4.4 Analýza vzorků moči druhého odběru	50
5 DISKUZE.....	53
6 ZÁVĚR.....	59
7 LITERATURA	60
8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	66
9 PŘÍLOHY	68
9.1 Příloha 1 - Tabulka zobrazující proteiny identifikované v experimentu pro výběr vhodné metody pro separaci proteinů.	68
9.2 Příloha 2 – Tabulka zobrazující proteiny identifikované v experimentu pro výběr vhodné proteasy pro štěpení proteinů	70
9.3 Příloha 3 – Tabulka zobrazující proteiny identifikované ve vzorcích moči prvního odběru.....	73
9.4 Příloha 4 - Tabulka zobrazující proteiny identifikované ve vzorcích moči druhého odběru.....	82

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Vypracování literární rešerše se zaměřením na problematiku močového systému, výskyt proteinů v moči, identifikaci proteinů v proteomice a identifikaci proteinů v moči

Experimentální část:

- Izolace proteinů z moči
- Výběr vhodné metody pro separaci proteinů v gelu
- Výběr vhodné proteasy pro štěpení proteinů v gelu
- Identifikace proteinů ve vzorcích moči pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF/TOF případně ESI-Q-TOF
- Srovnání rozdílů mezi experimentálními vzorky moči laboratorních potkanů u experimentálního modelu renální denervace

1 ÚVOD

Studium močového proteomu přináší informace o normální fyziologii, stejně jako o patologii onemocnění. Takto získané informace mohou sloužit pro diagnostiku různých chorob (Marimuthu *et al.*, 2011).

Ačkoli je koncentrace proteinů v moči přibližně tisíckrát nižší než v plasmě (Rodríguez-Suárez *et al.*, 2014), podle některých autorů mohou být proteinové biomarkery v moči detekovány citlivěji než v plasmě (Li *et al.*, 2014).

Proteomická analýza moči se potýká s několika překážkami. Těmi jsou nízká koncentrace celkových proteinů v moči, vysoká koncentrace solí a jiných složek, které brání separaci proteinů, a vysoká dynamika ve složení moči mezi jednotlivými odběry (Kalantari *et al.*, 2015). Pro úspěšnou analýzu se využívá různých kombinací metod pro zakoncentrování a separaci proteinů s následnou hmotnostně spektrometrickou analýzou (Adachi *et al.*, 2006). K rozvoji v oblasti analýzy močového proteomu došlo na začátku 21. století s využitím MS metod (Olszowy a Buszewski, 2014).

Ledviny hrají významnou roli v regulaci krevního tlaku prostřednictvím sympatického nervového systému (SNS) a renin-angiotensin-aldosteronového systému. Zvýšená aktivita SNS může přispívat k patogenezi hypertenze (Katholi a Rocha-Singh, 2009). Hypertenze se hojně vyskytuje u pacientů s chronickým onemocněním ledvin. Napomáhá dalšímu poškození ledvin a rozvoji kardiovaskulárních chorob (Campese *et al.*, 2011). Přerušování renálních nervů procesem renální denervace (RD) představuje léčbu hypertenze, pokud aktivita SNS přispívá jejímu rozvoji a to tak, že snižuje nepřiměřené uvolňování reninu a zadržování solí a obnovuje normální tlak krve. Denervace aferentních nervů navíc snižuje aktivitu centrálního SNS (Katholi a Rocha-Singh, 2009)

Změny močového proteomu v souvislosti se zákrokem RD podle dostupné literatury doposud nebyly studovány. Tyto změny by mohly přinést informace a fyziologických pochodech souvisejících se zákrokem RD.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Močový systém

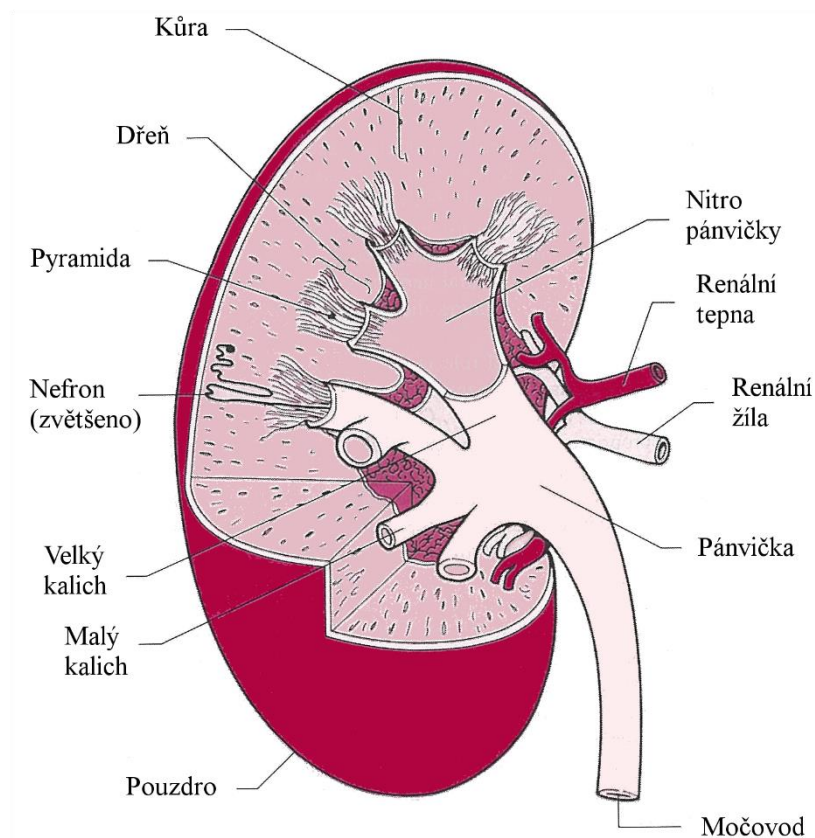
Močový systém je stěžejní pro odstraňování rozpuštěných produktů metabolismu z krve. S postupným zdokonalováním mechanismů látkové přeměny v průběhu fylogenetického vývoje, docházelo ke zvyšování účinnosti filtrace tekutiny a to především v důsledku vylepšování procesu zahušťování filtrátu, návratu pro organismus prospěšných látek zpět do krve a dodávání látek nežádoucích do vylučované tekutiny. U nejjednodušších obratlovců filtraci zajišťuje párový orgán *pronephros*, předledvina, který je u vývojově dokonalejších následován *mesonephros*, prvoledvinou. Třetí vývojovou generací orgánu je *metanephros*, ledvina (Čihák a Grim, 2002).

Funkčním orgánem u savců je *mesonephros* a *metanephros*. *Pronephros* se tvoří pouze jako jejich základ, který nepracuje (Jones, 2005). *Mesonephros* je embryonálním sekrečním orgánem, z něhož se ještě během embryogeneze vyvíjí *metanephros*, funkční orgán všech dospělých savců (Sainio a Raatikainen-Ahokas, 1999). Ledvina savců umožňuje tvorbu moči hyperosmotické vzhledem ke krvi. Tyto mechanismy jsou podmíněny důmyslnou stavbou funkční jednotky ledviny – nefronu. Nefrony se stavbou mezi jednotlivými zástupci savců výrazně neliší. Jsou známy rozdíly v samotném počtu nefronů a délce některých částí tubulárního systému (Hill *et al.*, 2008).

Kromě ledvin k močovému systému patří močové cesty. Z nitra ledviny moč přitéká do ledvinových kalichů, dále do ledvinové pánvičky a poté do močovodu, který ústí do močového měchýře, odkud tekutina odtéká močovou trubicí ven z organismu (Čihák a Grim, 2002).

2.1.1 Stavba ledviny

Na podélném řezu jsou patrné dvě oblasti (Obr. 1). Vnější oblast, kůra, a vnitřní, dřeň. Obě jsou tvořeny nefrony, krevními a lymfatickými cévami a nervy. Dřeň je rozdělena do 8 až 18 kuželovitých útvarů, ledvinových pyramid, se základnou směrem ke kůře. Zaoblené vrcholy pyramid se nazývají ledvinové papily. Moč z každé papily se sbírá do malých ledvinových kalichů. Dva až tři tyto kalichy ústí do velkých ledvinových kalichů, které jsou otevřeny do ledvinové pánvičky (Berne *et al.*, 1998; Čihák a Grim, 2002).

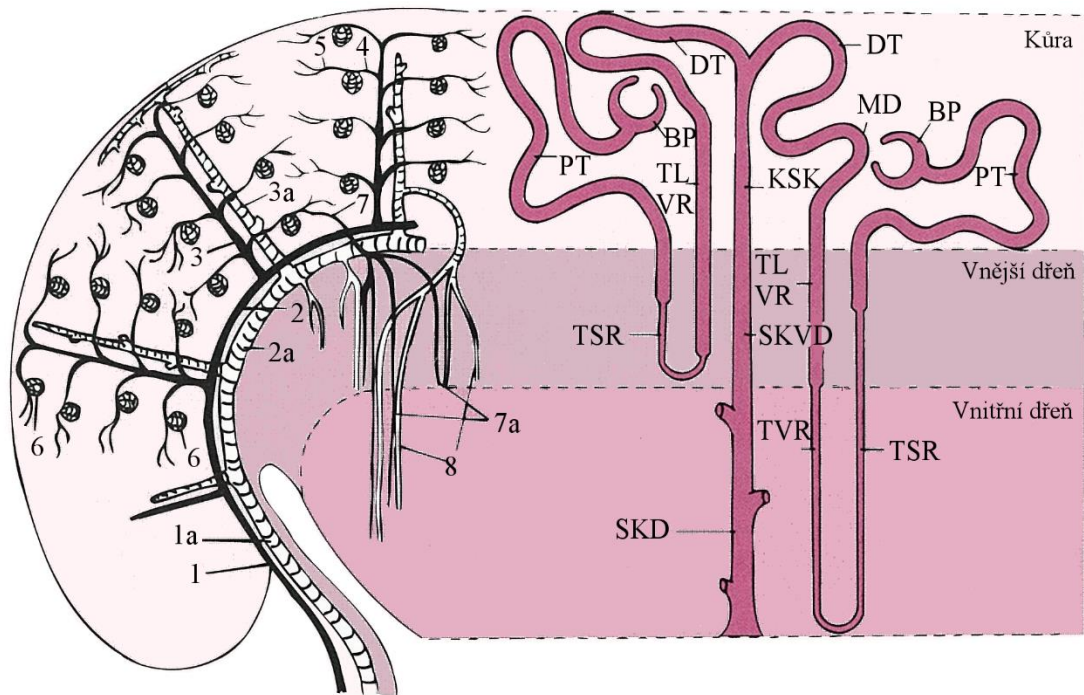


Obr. 1 Schematický nákres ledviny na podélném řezu (převzato a upraveno dle Berne *et al.*, 1998).

2.1.1.1 Cévní zásobení a inervace ledviny

S cévním zásobením ledvin souvisí jejich umístění v těle. Leží před páteří v úrovni jedenáctého až dvanáctého žebra, těsně nad pasem, uzavřeny mezi stěnou pobřišnice a kostmi a svaly zad v tzv. retroperitoneální dutině. To má význam jak pro jejich mechanickou ochranu a termostabilitu, tak pro zajištění minimální vzdálenosti od hlavního přívodu krve - břišní aorty (Langmeier *et al.*, 2009; Silverthorn *et al.*, 2010).

Z břišní aorty odstupují hlavní větve zásobující každou ledvinu - renální tepny. Renální tepna se postupně větví za vzniku interlobární, arkuátní, interlobulární tepny a aferentní tepénky, která vytváří glomerulární kapilární síť - glomerulus, jak je znázorněno na Obr. 2 (vlevo). Glomerulární kapiláry se sbíhají v eferentní tepénku, která vytváří peritubulární kapilární síť zásobující krví zbytek nefronu. Tato síť se liší podle toho, jaké nefrony obklopuje. Peritubulární kapiláry korových nefronů tvoří krátkou, ale bohatou síť. U juxtamedulárních nefronů tvoří *vasa recta*, které obklopují dlouhé Henleovy kličky těchto nefronů. Peritubulární kapilární síť obklopuje vždy jiné nefrony, než ze kterých vznikla.



Obr. 2 Vlevo. Schematický náčrt cévního systému lidské ledviny. (1) interlobární tepna, (2) arkuátní tepna, (3) interlobulární tepna, (4) aferentní tepénka, (5) eferentní tepénka, (6) glomerulus, (7) eferentní arteriola větvcící se na sestupnou *vasa recta*, (7a) *vasa recta* ve vnější a vnitřní dřevě, (8) vzestupná *vasa recta*, (3a) interlobulární žíla, (2a) arkuátní žíla, (1a) interlobární žíla. Vpravo. Schematický náčrt lidského nefronu. Korový nefron nalevo, juxtamedulární nefron napravo. (BP) Bowmanovo pouzdro, (DT) distální tubulus, (KSK) korový sběrný kanálek, (MD) *macula densa*, (PT) proximální tubulus, (SKD) sběrný kanálek ve vnitřní dřevě, (SKVD) sběrný kanálek ve vnější dřevě, (TLVR) tlusté vzestupné raménko, (TSR) tenké sestupné raménko, (TVR) tenké vzestupné raménko (převzato a upraveno dle Berne *et al.*, 1998).

Spojením peritubulárních kapilár vzniká nejprve interlobulární žíla, poté arkuátní, interlobární a renální žíla, která probíhá vedle močovodu (Berne *et al.*, 1998; Tesař *et al.*, 2006).

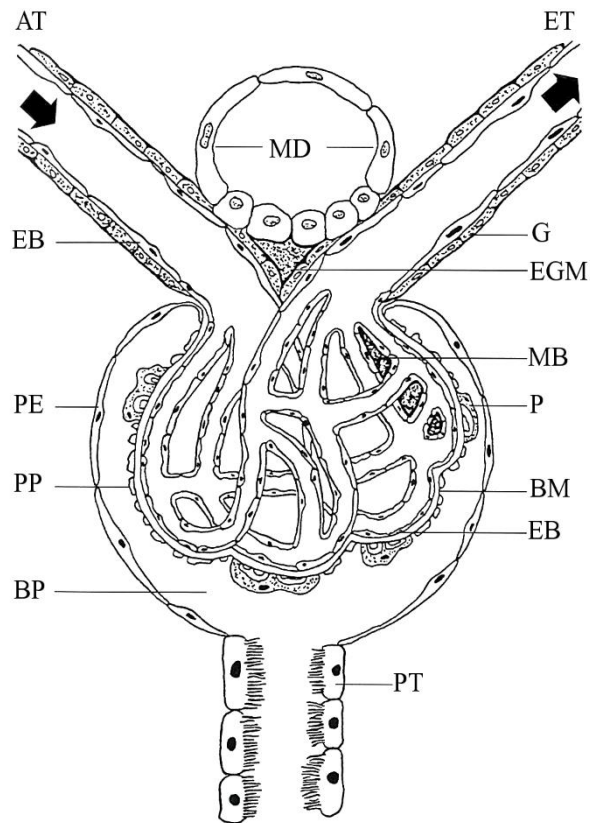
Ledviny jsou inervovány pouze sympatickou částí vegetativního nervového systému. Renální nervy pomáhají regulovat průtok krve ledvinami, rychlost glomerulární filtrace a zpětnou absorpci vody a solí v nefronu. Adrenergní vlákna přiléhají k buňkám hladké svaloviny renální, interlobární, arkuátní, interlobulární tepny a k aferentním a eferentním tepénkám. Nervová vlákna také inervují epitelové buňky tubulárního systému a sběrného kanálku. Aktivací vláken dochází ke zvyšování reabsorpce sodíku těmito segmenty. Inervují rovněž granulární buňky juxtaglomerulárního aparátu produkující renin (EC 3.4.23.15). Při zvýšené aktivitě sympatiku dochází k uvolňování reninu z těchto buněk (Berne *et al.*, 1998; Langmeier, *et al.*, 2009).

2.1.1.2 Stavba nefronu

V ledvině dospělého člověka je přítomno přibližně 1,2 milionu nefronů. Asi 80 % nefronů se nachází v kůře, nefrony korové. Ostatní nefrony se nazývají juxtamedulární a zanořují do vnitřní dřene, jak je znázorněno na Obr. 2 (vpravo). Nefron se skládá z renální korpuskule, proximálního tubulu, Henleovy kličky a distálního tubulu.

Na začátku nefronu je Bowmanovo pouzdro, které obklopuje glomerulus. Endotel glomerulu je fúzován s epitelem Bowmanova pouzdra, což umožňuje filtraci tekutiny přímo do lumenu tubulu. Tento útvar je se nazývá renální korpuskule (Berne *et al.*, 1998; Silverthorn *et al.*, 2010).

Struktura renální korpuskule je zobrazena na Obr. 3. Kapiláry jsou pokryty epitelovými buňkami, podocyty, a tvoří viscerální vrstvu Bowmanova pouzdra. Současně na jeho vaskulárním pólu přechází v parietální vrstvu. Prostor mezi vrstvami je nazývá Bowmanův prostor. Ten přechází na odtokovém pólu pouzdra v proximální tubulus. Endotel glomerulárních kapilár, bazální membrána a prstovité výběžky podocytů představují glomerulární filtrační bariéru. Endotel je fenestrován, otvory mají velikost 700 Å, a volně prostupný pro molekuly vody, sodné ionty, močovinu, glukosu, také pro malé proteiny, nikoli však pro buňky. Endotelové buňky nesou na svém povrchu záporně nabitě glykoproteiny, které znesnadňují filtraci velkých záporně nabitých proteinů. Také bazální membrána, obsahující negativně nabitě proteiny jako jsou kolagen typu IV, laminin, fibronectin, vytváří důležitou filtrační bariéru pro plasmatické proteiny nesoucí rovněž negativní náboj. Prstové výběžky podocytů obtácejí kapiláry na povrchu bazální membrány a mezi těmito výběžky vytváří filtrační štěrbinu. Filtrační štěrbinu je překryta porézní membránou s otvory o velikosti 140 Å a omezuje tak filtraci proteinů a jiných makromolekul, které prostoupily skrz endotel a bazální membránu. Filtrační štěrbinu obsahuje unikátní proteiny, jako nefrin a podocin, jejichž absence nebo nedostatek je podle některých studií příčinou úniku proteinů přes glomerulární filtrační bariéru do moči. Další důležitou součástí renální korpuskule je mesangium. Mesangium se skládá z mesangiových buněk a mesangiové matrix. Mesangiové buňky obklopují glomerulární kapiláry a představují pro ně strukturální podporu. Navíc sekretují mesangiovou matrix, prostaglandiny a cytokiny. Mesangiové buňky se mohou smršťovat a měnit průtok krve kapilárami.



Obr. 3 Schematický náčrt renální korpuskule. (AT) aferentní tepénka, (ET) eferentní tepénka, (BM) basální membrána, (BP) Bowmanův prostor, (EB) endotelová buňka, (G) granulární buňka eferentní tepénky, (MB) mesangiová buňka, (MD) *macula densa*, (P) podocyt, (PE) parietální epitel, (PP) prstový výběžek podocyty, (PT) proximální tubulus (převzato a upraveno dle Berne *et al.*, 1998).

Mesangiové buňky ležící mimo glomerulus se nazývají extraglomerulární mesangium a spolu s buňkami *macula densa* tlustého vzestupného raménka a granulárními buňkami aferentní a eferentní arterioly tvoří juxtaglomerulární aparát v místě, kde se ledvinové tělísko setkává se svým tubulárním systémem. Juxtaglomerulární aparát je zapojen v zpětnovazebném mechanismu regulace průtoku krve ledvinami a rychlosti glomerulární filtrace. Granulární buňky aferentní a eferentní arterioly jsou modifikované buňky hladké svaloviny, které tvoří, skladují a uvolňují renin, který umožňuje tvorbu angiotensinu II (ANG II) a sekreci aldosteronu (Berne *et al.*, 1998; Langmeier *et al.*, 2009; Silverthorn *et al.*, 2010).

Glomerulární filtrát z Bowmanova pouzdra přitéká do proximálního tubulu (Obr. 2 vpravo). Proximální tubulus vytváří několik záhybů, poté se zanořuje do dřene jako přímý segment. Na tento segment navazuje Henleova klička, která se skládá z tenkého sestupného raménka zakončeného kličkou a u juxtamedulárních nefronů také z tenkého vzestupného raménka. Následuje tlusté vzestupné raménko Henleovy kličky, jehož

koncová část prochází mezi aferentní a eferentní arteriolou a nazývá se *macula densa*. Tato část ústí do distálního tubulu. Dva nebo více distálních tubulů se sbíhají v kůře a vytváří sběrný kanálek, který moč přivádí do ledvinových kalichů (Berne *et al.*, 1998; Langmeier *et al.*, 2009).

Jednotlivé tubulární segmenty se od sebe liší typem buněk v závislosti na převažujícím transportu. Buňky proximálního tubulu mají značně zesílenou apikální část membrány a vytváří kartáčový lem vysokých mikrokloků. Basolaterální strana membrány obsahuje invaginace s četnými mitochondriemi. Mitochondrie dodávají energii pro transport iontů a malých molekul proti koncentračnímu gradientu. Buňky proximálního tubulu obsahují také transportní a dýchací enzymy, fosfatasy, peptidasy. Tenké sestupné a vzestupné raménko Henleovy kličky je tvořeno nízkými oploštělými buňkami pouze s několika mitochondriemi. Buňky tlustého vzestupného raménka a distálního tubulu jsou bohaté na mitochondrie, basolaterální membrána obsahuje hluboké invaginace, apikální membrána krátké řidší mikroklokky. Buňky distálního tubulu obsahují také enzymy spojené s aktivním transportem iontů (Berne *et al.*, 2008; Čihák a Grim, 2002).

2.1.2 Funkce ledviny

Kromě odstraňování odpadních produktů metabolismu a tvorby moči zastávají ledviny řadu jiných neméně důležitých funkcí. Regulují objem extracelulární tekutiny a krevní tlak, udržují stálou osmolaritu krve, zajišťují rovnovážnou koncentraci důležitých iontů v krvi, pomáhají udržovat pH krve a produkují hormony (Silverthorn *et al.*, 2010).

Zdravý dospělý člověk vyprodukuje 1 až 2 litry moči za 24 hodin. Na tvorbě moči se podílejí procesy glomerulární filtrace (GF), tubulární resorpce a tubulární sekrece (Kittnar *et al.*, 2011).

2.1.2.1 Regulace glomerulární filtrace

GF představuje přestup ultrafiltrátu krevní plasmy z glomerulárních kapilár do Bowmanova pouzdra a proximálního tubulu. Za klidových podmínek protéká ledvinami asi 625 ml plasmy za minutu, přičemž každou minutu vznikne přibližně 125 ml ultrafiltrátu. To je 180 l za 24 hodin.

GF umožňuje glomerulární filtrační tlak, který je dán velikostí Starlingových sil. Starlingovy síly jsou odpovědné za udržování rovnováhy tekutin mezi cirkulací a okolními tkáněmi (Taylor, 1981). V ledvinách těmito silami jsou: hydrostatický tlak

v glomerulárních kapilárách (P_{GC}), hydrostatický tlak v Bowmanově pouzdře, onkotický tlak (tlak určovaný koncentrací proteinů [Morissette, 1977]) v Bowmanově pouzdře a onkotický tlak v glomerulárních kapilárách. Konstantní GF je udržována jak lokálními, tak centrálními mechanismy (Kittnar *et al.*, 2011).

Mezi lokální mechanismy patří myogenní autoregulace a tubuloglomerulární zpětná vazba (TGF). Myogenní mechanismus je umožněn sensorickým elementem regulujícím napětí svalových buněk cévní stěny. Zjednodušeně, zvýšením arteriálního tlaku krve dojde ke zvýšení tlaku v aferentní arteriole, vzroste napětí cévní stěny a sledem následných reakcí dojde k vasokonstrikci příslušné cévy. Výsledkem je normalizace průtoku i tlaku za místem vasokonstrikce, tedy v glomerulárních kapilárách. Snížení arteriálního tlaku krve vede k opačné reakci.

TGF je umožněna receptory v *macula densa*, které monitorují průtok tubulární tekutiny nepřímo prostřednictvím iontů Na^+ . Zvýšení krevního tlaku zapříčiní vzestup P_{GC} a GF, následně se také zvýší dodávka sodných iontů do *macula densa*, což způsobí produkci sloučeniny, která způsobí vasokonstrikci aferentní arterioly, pokles P_{GC} a návrat GF. Při snížení krevního tlaku je průběh opačný.

Oba lokální mechanismy se uplatňují při kolísání středního arteriálního tlaku krve v rozmezí 80 a 180 mm Hg, ovšem i tak se velikost GF lehce mění a proto se uplatňují i centrální mechanismy řízení, zejména sympatický nervový systém, adrenalin, ANG II, prostaglandiny a adenosin (Tesař *et al.*, 2006; Kittnar a Mlček, 2009; Kittnar *et al.*, 2011).

2.1.2.2 Regulace tubulárních procesů

Úkolem tubulární resorpce a sekrece je úprava výsledného objemu a složení moči. Resorpce solutů je umožněna jak pasivním (paracelulární a transcelulární cesta), tak primárním nebo sekundárním aktivním transportem (transcelulární cesta). Aktivní část sekundárního aktivního transportu vždy představuje Na^+/K^+ -ATPasová pumpa (EC 3.6.3.9) na basolaterální membráně. Vzniklý koncentrační gradient pro sodík potom umožňuje jeho přechod z tubulární tekutiny přes apikální membránu do epitelové buňky pomocí symportérů nebo antiportérů. Voda je transportována vždy pasivně, difunduje ve směru osmotického gradientu (Kittnar *et al.*, 2011).

Zpětné vstřebávání iontů a vody se v jednotlivých segmentech tubulu liší. Regulace tubulárních procesů probíhá taktéž lokálními a centrálními řídicími mechanismy. Lokální regulační mechanismy se uplatňují v proximálním tubulu a to tak, aby

docházelo k resorpci 67 % objemu tubulární tekutiny. Využívá se efektu Starlingových sil v krevní plasmě peritubulárních kapilár a glomerulární rovnováhy.

V peritubulárních kapilárách se v závislosti na GF značně mění onkotický tlak plasmatických bílkovin. Při zvýšené GF se více tekutiny odstraní v glomerulech a koncentrace plasmatických proteinů v krvi eferentní arterioly stoupá. Důsledkem je zvýšená resorpce vody a rozpuštěných látek do peritubulární kapilární sítě. Tento mechanismus je podpořen procesem nazývaným glomerulární rovnováha, který je také úměrný GF. Zvýšení GF vede k nárůstu celkového množství filtrovaných rozpuštěných látek. Glukosa a aminokyseliny jsou vstřebávány v první části proximálního tubulu. Reabsorpce těchto sloučenin je doprovázena ionty Na^+ a následně vodou. Objem resorbované tekutiny se zvyšuje.

Z centrálních regulačních mechanismů se významně uplatňují ANG II, aldosteron, atriální natriuretický peptid a katecholaminy pro reabsorpci NaCl a antidiuretický hormon pro řízení vstřebávání vody (Kittnar a Mlček, 2009; Kittnar *et al.*, 2011).

2.1.3 Centrální mechanismy řízení funkce ledvin

2.1.3.1 Sympatický nervový systém

Sympatická nervová vlákna jsou v kontaktu s cévami, tubuly a granulárními buňkami juxtaglomerulárního aparátu, jak bylo popsáno v kapitole 2.1.1.1. SNS má vliv na velikost glomerulární filtrace a uplatňuje se také při tubulární reabsorpci Na^+ (Obr. 4). SNS je stále tonicky aktivní. Aktivita je zvýšena během pohotovostních reakcí, při fyzické námaze nebo při silném emočním vypětí. Sensorické informace jsou zpracovány v hypotalamu nebo mozkovém kmeni, následně dochází ke změnám aktivity neuronů a uvolnění neurotransmiteru, noradrenalinu, do efektorové tkáně. Noradrenalin v ledvinách účinkuje na α_1 a β_1 adrenergní receptory (McCorry, 2007). Působením na α_1 receptory v aferentní arteriole dochází k vasokonstrikci. Důsledkem je snížení průtoku krve ledvinou a také snížení GF (Kittnar *et al.*, 2011) α_1 -adrenoreceptory se vyskytují také na basolaterální membráně epitelových buněk tubulu. Jejich aktivací a následným sledem reakcí dochází ke zvýšené aktivitě Na^+/K^+ -ATPasové pumpy, a tak se zvyšuje reabsorpce NaCl v stočeném proximálním tubulu, tlustém vzestupném raménku Henleovy kličky, stočeném distálním tubulu a sběrném kanálku (DiBona, 2003). Adrenoreceptory se nacházejí na povrchu granulárních buněk juxtaglomerulárního aparátu, ve kterých dochází k syntéze reninu. Působením

noradrenalinu dochází k sekreci reninu těmito buňkami, čímž se sekundárně zvyšuje aktivita renin-angiotensinového systému (RAS). Granulární buňky jsou zároveň baroreceptory. Pokles krevního tlaku zvyšuje sekreci reninu a opačně (Tesař *et al.* 2006; McCorry, 2007). Třetím mechanismem regulace sekrece reninu je mechanismus *macula densa*. Jakmile buňky *macula densa* zaznamenají pokles iontů chloridu sodného ve filtrátu v distálním tubulu, je spuštěna sekrece reninu (Sparks *et al.*, 2014).

Zvýšená aktivita SNS během pohotovostní reakce nebo cvičení vede také ke stimulaci buněk dřeně nadledvin a uvolňování katecholaminů, noradrenalinu a adrenalinu, do krevního oběhu. Tyto hormony se také váží na zmíněné receptory a vyvolávají stejný účinek. Kromě toho vykazuje adrenalin afinitu k β_2 -adrenoreceptorům a způsobuje tak zvýšení srdeční činnosti a relaxaci hladkého svalstva (McCorry, 2007).

Příliš vysoká aktivita renálního SNS působí centrálně, zvyšuje sympatickou aktivitu v jiných částech krevního řečiště a přispívá k patogenezi kardiovaskulárních chorob zejména hypertenze. Nadměrná aktivita srdečního a renálního SNS je známkou chronického srdečního selhání (Katholi and Rocha-Singh, 2009; Barrett *et al.*, 2015).

Organismus může kontrolovat aktivitu eferentních renálních nervů více způsoby. Důležitou funkci v regulaci eferentní sympatické aktivity mají aortální a karotidové baroreceptory, srdeční mechanoreceptory a také renorenální reflexy kontralaterální ledviny. V situaci kdy renální krevní řečiště přijímá více sympatických nervových vzruchů než ostatní řečiště, narůstá odpor v renálních cévách, dochází ke zvýšení aktivity reninu v plasmě a zvyšuje se reabsorpce vody a sodíku. Takový stav nastává v případě esenciální hypertenze.

Farmakologická léčba esenciální hypertenze využívá několik přístupů. β -blokace snižuje uvolňování reninu, inhibice angiotensin-konvertujícího enzymu (EC 3.4.15.1), blokace angiotensinového receptoru či inhibice reninu zamezuje účinku ANG II, α -blokace snižuje odpor v renálních cévách a diuretikum působí proti zadržování vody a sodíku. Tyto přístupy nejsou vždy účinné nebo mají vedlejší účinky, užívání je nutné pravidelně dodržovat a léčba může být nákladná (Katholi and Rocha-Singh, 2009).

Definitivní, orgánově specifickou léčbou je RD. Metoda představuje přerušení nebo odstranění sympatických nervových vláken. RD umožňuje snížení krevního tlaku, ale také působí centrálně a snižuje aktivitu srdečního SNS a riziko srdeční arytmie (Barrett *et al.*, 2015). V neposlední řadě představuje možnost efektivní léčby rezistentní hypertenze, která je definována jako přetrvávající vysoký krevní tlak navzdory užívání tří

antihypertenziv z různých tříd, z nichž jedno je diuretikum (Calhoun *et al.*, 2008; Prochnau *et la.*, 2013).

2.1.3.2 Angiotensin II

ANG II vzniká kaskádou RAS. Množství plasmového ANG II je limitováno reninem (Obr. 4). Renin štěpí angiotensinogen, glykoprotein syntetizovaný játry, v menší míře ledvinami, za vzniku angiotensinu I (ANG I), dekaeptid, který je dále štěpen angiotensin-konvertujícím enzymem, ale i jinými enzymy, na ANG II, oktapeptid. ANG II je poté přeměněn proteolytickými enzymy na metabolity, které byly dlouho považované za neaktivní. Mezi tyto metabolity patří například angiotensin III, který nezávisle na ANG II stimuluje syntézu a sekreci aldosteronu v kůře nadledvin (Tesař *et al.*, 2006).

Účinky ANG II jsou rozmanité. Zvyšuje objem extracelulární tekutiny. Způsobuje vazokonstrikci renálních i systémových arteriol, čímž zvyšuje krevní tlak. Aktivací angiotensinových receptorů v mozku zvyšuje aktivitu SNS, který inervuje srdce a cévy. Stimuluje tak činnost srdce a také uvolňování katecholaminů ze zakončení sympatických nervů i z dřeně nadledvin. Zvyšuje pocit žízně a sekreci antidiuretického hormonu. Podněcuje syntézu a sekreci aldosteronu. Ovlivňuje také insulinovou sensitivitu periferních tkání a může být zapojen v rozvoji insulinové resistance. V ledvinách má vliv jak na tubulární transport, tak na hemodynamiku (Tesař *et al.*, 2006; Harrison-Bernard, 2009).

ANG II působí na AT₁ a AT₂ receptory na povrchu buněk. Většina účinků ANG II je umožněna přítomností AT₁ receptoru. AT₁ receptory jsou lokalizovány na luminální a basolaterální membráně buněk proximálního a distálního tubulu. ANG II přímo zvyšuje reabsorpci vody a NaCl těmito segmenty (Harrison-Bernard, 2009). Receptory AT₂ se vyskytují především v oblasti proximálního tubulu, aferentní a eferentní arterioly, ale také v nadledvinkách a mozku. Jejich exprese se po narození výrazně snižuje, avšak může být regulována ANG II a některými růstovými faktory. AT₂ receptory se pravděpodobně podílejí na reabsorpci sodíku v proximálním tubulu. Funkce AT₂ receptorů je v současné době intenzivně zkoumána. Spekuluje se, že aktivace AT₂ receptorů vyvolává přesně opačný efekt než aktivace AT₁ receptorů, což by zamezilo případným nežádoucím účinkům při nadměrné aktivitě RAS (Tesař *et al.*, 2006; Sparks *et al.*, 2014). Nadměrná aktivita RAS může být způsobena zvýšenou sympatoexcitací při chronickém srdečním selhání. V této souvislosti byla zkoumána

exprese angiotensinových receptorů u experimentálního modelu králíka. Byla zjištěna zvýšená exprese AT₁ receptoru a pokles v expresi receptoru AT₂ (Clayton *et al.*, 2011).

ANG II přímo působí také na buňky hladkého svalstva renálních cév. Způsobuje vazokonstrikci aferentní a eferentní arterioly, snižuje tedy průtok krve ledvinami. Zvýšená hladina intrarenálního ANG II zvyšuje citlivost mechanismu tubuloglomerulární zpětné vazby a tím přispívá k reabsorpci vody a sodíku (Harrison-Bernard, 2009).

2.1.3.3 Aldosteron

Aldosteron je steroidní hormon syntetizovaný v kůře nadledvin. Jeho sekreci podněcuje ANG II (Obr. 4) nebo zvýšená koncentrace iontů K⁺ v plasmě. Aldosteron se váže na steroidní receptory epitelových buněk distálního tubulu, sledem reakcí dochází ke stimulaci exprese proteinů zodpovědných za následující změny: zvýšení aktivity Na⁺/K⁺-ATPasové pumpy v tomto segmentu, zvýšení aktivity enzymů cyklu trikarboxylových kyselin a produkce ATP, zvýšení exprese a aktivace epitelových sodných kanálů, které umožňují vstup Na⁺ a nárůst počtu draselných kanálů pro sekreci K⁺ (Harrison-Bernard, 2009). Tato cesta závislá na expresi genu představuje prodlevu v odpovědi asi 0,5-1,0 hod (Booth *et al.*, 2002). Avšak aldosteron po navázání na mineralokortikoidní receptor v buňce aktivuje také mimojadernou signální dráhu. Tímto negenomovým mechanismem může být reabsorpce Na⁺ či sekrece K⁺ iontů kontrolována v řádu sekund nebo minut (Dooley *et al.*, 2012). Aldosteron má vliv také na krevní tlak, neboť reabsorpce Na⁺ je následována reabsorpcí vody a zvýšením krevního tlaku (Booth *et al.*, 2002).

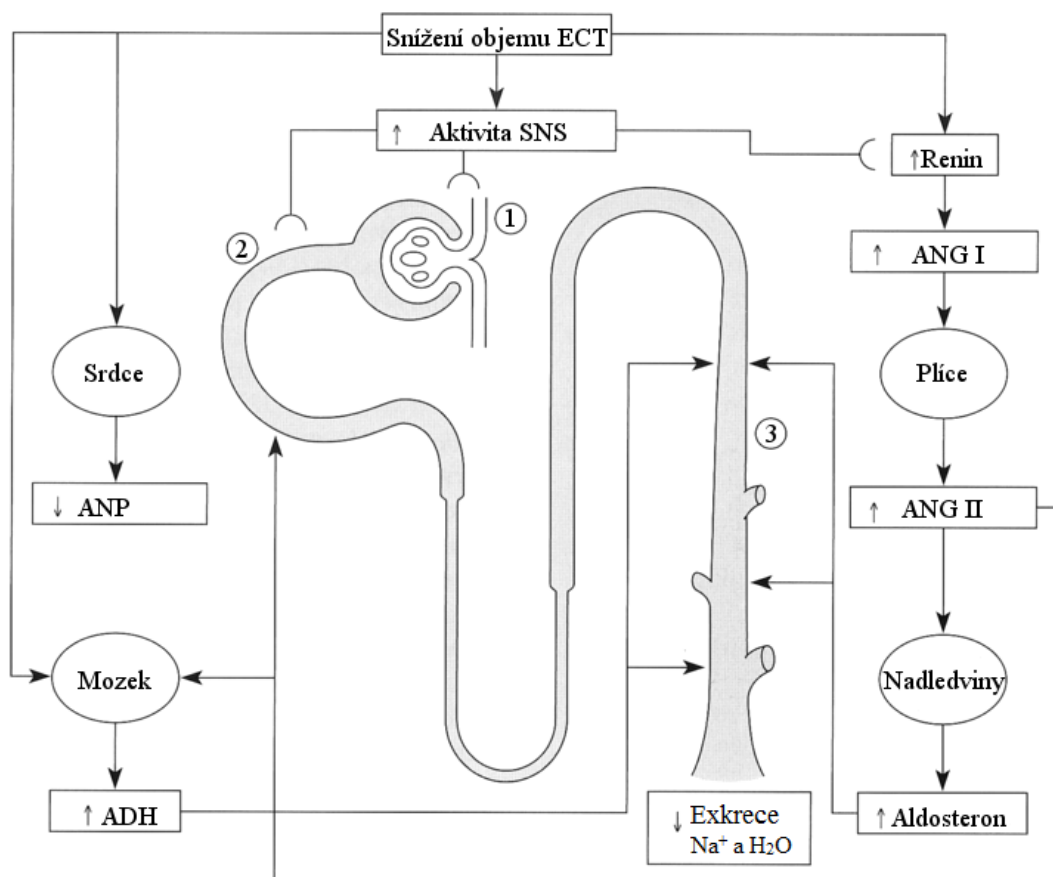
2.1.3.4 Antidiuretický hormon

Antidiuretický hormon (ADH) neboli vasopresin je syntetizován v hypotalamu a skladován v neurohypofýze odkud je uvolňován především při vysoké osmolalitě krevní plasmy (Obr. 4). ADH ovlivňuje renální funkci působením na V1 a V2 receptory. Aktivací V1 receptoru hladkého svalstva cév dochází k vazokonstrikci. V2 receptory se nachází v buňkách distálního tubulu a sběrného kanálku. Působením ADH dochází k mobilizaci akvaporinových kanálů. Tyto kanály jsou vkládány do apikální membrány a umožňují pasivní reabsorpci vody v těchto segmentech (Sharman and Low, 2008).

2.1.3.5 Atriální natriuretický peptid a prostaglandiny

Atriální natriuretický peptid (ANP) má opačný efekt než výše uvedené mechanismy. ANP je produkován pravou srdeční síní v závislosti na jejím roztažení. Pokles efektivního cirkulujícího objemu tedy snižuje jeho uvolňování (Obr.4). ANP zvyšuje exkreci sodíku ledvinami, lépe tlumí reabsorpci Na^+ iontů v těch segmentech, ve kterých ji ANG II stimuluje. Inhibuje sekreci reninu a také syntézu aldosteronu. Způsobuje renální vasodilataci (Maack, 1996; Tesař *et al.*, 2006)

Vasodilatační účinky mají také prostaglandiny. Působí na aferentní a eferentní arteriolu. Uplatňují se především v patologických situacích, jako je významná ztráta krve, kdy tlumí příliš velký vasokonstrikční účinek katecholaminů a ANG II. Lze tak předejít případné renální ischemii (Kittnar *et al.*, 2011).



Obr. 4 Schéma znázorňující spolupráci centrálních mechanismů řízení funkce ledvin při snížení objemu extracelulární tekutiny (ECT), která vede ke snížení GF (1), zvýšení reabsorpce NaCl a vody v proximálním tubulu a Henleově kličce (2) a zvýšení reabsorpce NaCl a vody v distálním tubulu a sběrném kanálku (3) (převzato a upraveno dle Harrison-Bernard, 2009).

2.2 Proteiny v moči - proteinurie

Průměrné hodnoty vyloučených proteinů močí jsou uváděny v rozmezí 10 až 210 mg za den, častěji však 50 až 80 mg za den, jedná se o fyziologickou proteinurii. U zdravých osob pochází 40 až 60 % vyloučených proteinů z ledvin a močových cest (Tesař *et al.*, 2006). Glomerulem prochází do primární moči albumin a mikroproteiny, což jsou proteiny o menší molekulové hmotnosti, než má albumin, tedy 69 kDa. Tubulární buňky pak většinu proteinů z primární moči resorbují (Racek *et al.*, 1999).

Na povrchu endotelu glomerulárních kapilár se nacházejí záporně nabitě proteoglykany, které podmiňují elektrostatickou repulsi. Proteiny z plasmy s negativním nábojem jsou tlačeny do středu kapilárního toku a je tak omezena jejich filtrace přes kapilární stěnu. Filtrace malých molekul je omezena diferencovaným laminárním tokem molekul o různé velikosti. Velké molekuly se nachází po obvodu laminárního toku a obklopují menší molekuly. Filtraci proteinů ovlivňuje také kontrakce myofibril mesangiálních buněk a následná deformace basální membrány. Tato deformace způsobí otevření větších, zkratových, pórů a průnik proteinů do ultrafiltrátu bez ohledu na náboj a velikost. Tento efekt vyvolávají vasoaktivní látky, zejména ANG II. Proteiny s molekulovou hmotností menší než 30 kDa pronikají do ultrafiltrátu téměř bez omezení. Patří k nim mikroglobuliny, cystatin C, vazebný protein pro retinol a volné řetězce imunoglobulinů (Tesař *et al.*, 2006).

Resorpce proteinů probíhá v proximálním tubulu vazbou na receptory na povrchu mikrokloků. Jsou známé dva receptory, které to umožňují, megalin a kubilin. Po navázání proteinu na receptor je komplex endocytován, proteiny jsou přepraveny do lysosomu, zatímco receptory jsou recyklovány a vrací se do apikální membrány. Proteiny jsou v lysosomu štěpeny proteasami, sloučeniny, které na ně byly navázány a mohou být pro tělo užitečné, jako vitamin A, vitamin D, vitamin B12 nebo železo, jsou vráceny do krevního oběhu (Christensen *et al.*, 2009). Degradčních produkty proteinů jsou vyloučeny do moči.

Proteiny se váží na tubulární receptory nescificky, ale vazebná afinita receptorů se přitom liší. Při rozdílných koncentracích proteinů v ultrafiltrátu dochází ke kompetitivní inhibici resorpce a zvýší se exkrece těch, které jsou přítomny v nižších koncentracích. Velmi vysokou vazebnou afinitu vykazují receptory pro volně filtrované nízkomolekulární proteiny. Jejich zvýšená koncentrace v plasmě, respektive v ultrafiltrátu, se zvýšenou exkrecí do moči projeví až při velmi vysokých

koncentracích. Ovšem pokud se v plasmě zvýší koncentrace pouze jednoho z nich např. Bence-Jonesova proteinu (volné monoklonální lehké řetězce) bude docházet ke kompetitivní inhibici resorpce všech ostatních proteinů (Bernard *et al.*, 1987; Tesař *et al.*, 2006).

2.2.1 Patologická proteinurie

Jakákoli porucha ledvin má za následek ztráty proteinů z těla. Poškození ledvin a následně zvýšené vylučování proteinů močí vyvolávají toxické látky. Proteinurii zvyšuje vysoký krevní tlak a některé infekce. Různé typy maligních nádorů a také diabetes typu I způsobují nadměrné ztráty albuminu (Novák, 2002).

Vzhledem k ledvinám se rozlišují tři typy patologické proteinurie: renální, prerenální a postrenální. Příčinou renální proteinurie je onemocnění ledvin. Při poškození glomerulárního filtru se jedná o glomerulární proteinurii. Projevuje se vyšším obsahem albuminu a proteinů do 100 kDa v moči v důsledku ztráty negativního náboje membrány – glomerulární selektivní proteinurie. Při větším poškození dochází k průniku proteinů o větší molekulové hmotnosti jako IgG imunoglobulin – glomerulární neselektivní proteinurie (Racek *et al.*, 1999). Při poškození tubulárních buněk nemohou být vstřebány volně filtrované proteiny plasmy, nastává tubulární proteinurie. V moči se objevují nízkomolekulární proteiny a albumin zhruba ve stejném poměru (Tesař *et al.*, 2006). Při těžké glomerulární proteinurii nestačí být proteiny vstřebány a v moči se objeví i tubulární složka, pak se hovoří o proteinurii smíšené, nebo též „over-flow“. Nastává také při současném postižení glomerulů a tubulů (Racek *et al.*, 1999). U prerenální proteinurie není funkce nefronu narušena. Příčinou je vysoká koncentrace nízkomolekulárních proteinů v plasmě, které procházejí do ultrafiltrátu volně a po překročení kapacity tubulární resorpce jsou vylučovány močí. Typicky se jedná o hemoglobin při intravaskulární hemolýze, myoglobin při zhmoždění svalů a Bence-Jonesův protein při některých maligních monoklonálních gamapatiích. U postrenální proteinurie pochází proteiny z močových cest. Proteiny jsou zde syntetizovány a sekretovány do moči. U tohoto typu proteinurie mohou být v moči přítomny makromolekuly jako α -2-makroglobulin, IgM imunoglobulin, fibrinogen a lipoproteiny. Proteiny, které jsou syntetizovány v močových cestách, se mohou v moči vyskytovat při fyziologické proteinurii, jejich zvýšené množství v moči může být znakem zánětlivých, krvácivých či nádorových onemocnění močových cest (Racek *et al.*, 1999; Tesař *et al.*, 2006).

2.2.2 Diagnostika proteinů v moči

Průkaz a semikvantitativní analýzu proteinů v moči lze uskutečnit zákalovou reakcí nebo pomocí detekčních proužků. Průkaz zákalovou reakcí spočívá v denuraci proteinů kyselinou a vytvoření zákalu, jehož množství je vizuálně či turbidimetry hodnoceno. Pro srážení se nejčastěji používá kyselina sulfosalicylová. Po vytvoření kalibrační přímky, lze odečíst koncentraci celkových proteinů v moči, stejně jako u kolorimetrických metod. Pro stanovení proteinů v moči se využívá barviva Coomassie briliantové modří, pyrogallolové červeně nebo biuretového činidla a měří se absorbance barevného komplexu (Novák, 2002).

Stanovení močových proteinů detekčními proužky je levný test prováděný rutinně v klinické praxi. Výhodou je současné stanovení dalších parametrů moči. Test obvykle využívá kolorimetrické reakce mezi proteinem a tetrabromfenolovou modří. Intenzita zbarvení odpovídá koncentraci proteinů (Naderi a Reilly, 2008). Principem stanovení je reakce aminoskupin proteinů s indikátorem, v jejím důsledku dochází k posunu pH a změně zbarvení v místě indikátoru. Detekční proužek dokáže stanovit 100 % množství albuminu v moči, avšak ostatní proteiny jsou podhodnoceny. Výsledek je tedy tím správnější, čím větší je podíl albuminu na proteinurii (Tesař *et al.*, 2006).

Jelikož zmíněné metody jen hrubě odhadují koncentraci proteinů v moči a výsledky jsou zkresleny bilancí tekutin, možnou alternativou stanovení ztrát proteinů je sběr moči za 24 hodin. Úplnost sběru lze hodnotit podle exkrece kreatininu. Přesnější variantou může být stanovení poměru U-prot/U-Cr. Poměr 0,2 odpovídá 0,2 g proteinů vyloučených za den (Carroll a Temte, 2000; Tesař *et al.*, 2006).

Někdy je nutné stanovit koncentrace jednotlivých proteinů z plasmy, protože stejná koncentrace albuminu má různý význam podle přítomnosti a koncentrací jiných proteinů. Vzájemné poměry koncentrací tzv. indikátorových proteinů mohou poukazovat na určité patologické stavy. Kvalitativní analýzu proteinurie umožňuje elektroforéza (Tesař *et al.*, 2006).

Elektroforéza močových proteinů se provádí zejména s cílem detekovat kappa nebo lambda lehké řetězce imunoglobulinů (Bence-Jonesův protein), které se v moči objevují při mnohočetném myelomu a které nejsou v mnoha případech detegovány elektroforézou sérových proteinů. Na základě elektroferogramu lze navíc rozlišit glomerulární a tubulární proteinurii (Firkin, 2009; Jenkins, 2009).

2.3 Identifikace v proteomice

Proteomem je myšlen soubor proteinů v daném organismu, tkáni či buněčné kultuře, který je tvořen za určitých definovaných podmínek. Proteomika se zabývá analýzou tohoto souboru (Lovrić, 2011). Odvětví proteomiky, jehož hlavním cílem je identifikace, charakterizace či začlenění proteinu do biochemické dráhy se nazývá klasická, nebo také expresní proteomika. Oproti tomu funkční proteomika studuje terciární strukturu proteinů nebo protein-proteinové interakce. Identifikace probíhá přiřazením hmotnostně-spektrometrických dat k sekvencím z databáze na základě pravděpodobné shody. Proto je nezbytná tvorba proteinových map a databází (Westermeier *et al.*, 2008).

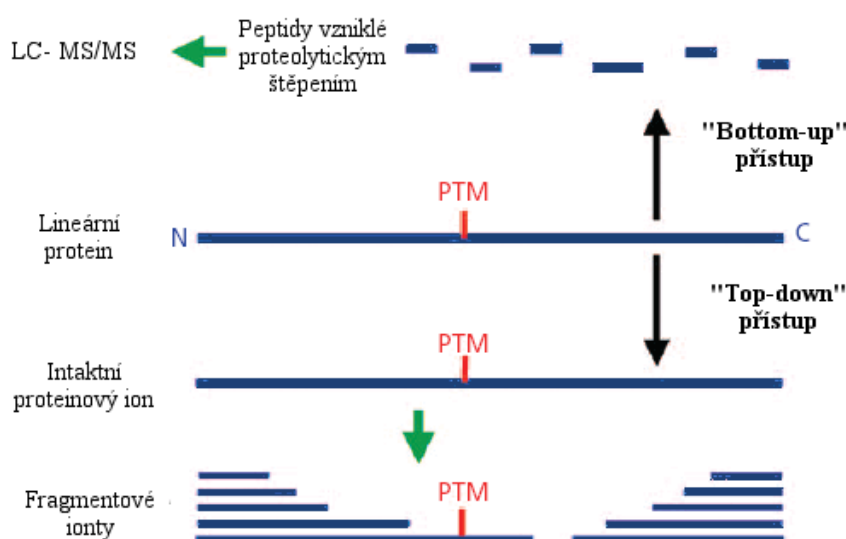
Největší význam má identifikace v diferenční proteomice. Tento přístup umožňuje vzájemné porovnání sady proteinů ve vzorcích, které jsou podobné, ale určitým způsobem se liší. Příkladem může být srovnání materiálu organismu normálního a nemocného, nemocného a léčeného nebo divokého kmene a mutantu. Experiment může být navržen pro hledání určitých proteinů nebo jako kvalitativní či kvantitativní analýza, co největšího počtu proteinů (Monteoliva a Albar, 2004; Lovrić, 2011). V současné době se diferenční proteomika využívá zejména ve výzkumu molekulárních mechanismů chorob (Dong *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015), vývoji vakcín (Sharma *et al.*, 2015) a léčiv (Chiu *et al.*, 2015), ke sledování odpovědi na léčbu (Chang *et al.*, 2015). Velké úsilí je vynakládáno na nalezení vhodných markerových proteinů chorob (Cordeiro *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2015) Tento přístup také pomáhá sledovat vliv vnějších podmínek na organismus, tím přispívá k pochopení fyziologie organismu a v případě rostlin může vést ke zdokonalení produkce biomasy (Iqbal *et al.*, 2014; Parkash *et al.*, 2014).

2.3.1 Strategie analýzy

K identifikaci proteinů ve vzorku pomocí hmotnostní spektrometrie lze přistupovat dvěma obecnými způsoby. „Bottom-up“ přístup představuje cestu identifikace od peptidu k proteinu. Protein je po separaci proteolyticky štěpen, trypsinem (EC 3.4.21.4) nebo jinou specifickou proteasou, peptidy jsou poté analyzovány hmotnostní spektrometrií (MS) nebo tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Pokud je „bottom-up“ přístup aplikován na směs proteinů bez separace, hovoří se o „shotgun“ proteomice. Oproti tomu „top-down“ přístup eliminuje použití proteasy a přímo

analyzuje proteiny na základě fragmentace v hmotnostním spektrometru (Obr. 5) (Zhang *et al.*, 2013; Kelleher *et al.*, 2014).

V případě „bottom-up“ analýzy je získaná proteinová směs obvykle nejprve separována polyakrylamidovou gelovou elektroforézou v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE), následuje proteolytické štěpení v gelu a získané peptidy jsou separovány kapalinovou chromatografií na obrácené fázi spojené s MS. U „top-down“ přístupu jsou analyzovány neštěpené proteiny, komplexnost vzorku je tedy menší než u „bottom-up“ přístupu a jsou zachovány všechny informace týkající se intaktního stavu proteinů včetně posttranslačních modifikací (PTM) a změn v sekvenci proteinu vzniklých v důsledku mutací nebo alternativního sestřihu mRNA, které jsou příčinou neúplné nebo nejednoznačné identifikace „bottom-up“ metodou. Studie využívající „top-down“ přístup se obvykle zaměřují na analýzu malého počtu proteinů nebo určitého proteinu získaného afinitní chromatografií (Tran *et al.*, 2011; Gregorich *et al.*, 2014), neboť nezbytná frakcionace intaktních proteinů zůstává stále výzvou (Xiu *et al.*, 2014). Avšak pomocí multidimenzionálních separačních technik bylo možné identifikovat i přes 1000 proteinů z komplexní směsi (Tran *et al.*, 2011). „Top-down“ přístup má svá omezení, která vyplývají z horší frakcionace, ionizace a fragmentace proteinů oproti peptidům. Kombinací „bottom-up“ a „top-down“ přístupu je „middle-down“ přístup, u kterého jsou pomocí štěpení specifickou proteasou získány větší peptidy, a jsou tak zachovány výhody „top-down“ metody, jako je možnost rozlišení isoformem a detekce PTM (Wu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013).



Obr. 5 Schéma „bottom-up“ a „top-down“ přístupu v proteomice (převzato a upraveno dle Wehr, 2006).

2.3.2 Separace v proteomice

Detekce všech proteinů přítomných v komplexním vzorku je obtížná. Proteiny přítomné ve více kopiích potlačují detekci méně zastoupených, přičemž právě tyto je obvykle snaha dokázat. Hojně zastoupené proteiny mohou být ze vzorku odstraněny imunoafinitně, avšak je možné, že jiné proteiny jsou na ně navázány a byly by také odstraněny ze vzorku. V každém případě je vhodné provést frakcionaci vzorku jednou nebo kombinací více metod (Camerini a Mauri, 2015).

Proteomická analýza tradičně zahrnovala elektroforetickou separaci intaktních proteinů i proteinových komplexů. Však v poslední době jsou více vyvíjeny přístupy, které nevyužívají dělení v gelu při separaci proteinů nebo dokonce vynechávají proteinovou separaci úplně a zaměřují se na produkci a separaci peptidů pomocí „gel-free“ technik, neboli bez využití gelu (GEF). Gelová separace proteinů či peptidů, „gel-based“ separace (GB), se využívá nejvíce v „bottom-up“ analýze. GEF mohou doplňovat GB techniky nebo mohou zajišťovat rozdělení směsi samostatně. GEF metody jsou využívány v „bottom-up“ i „top-down“ analýze (Lovrić, 2011).

2.3.2.1 Metody využívající separaci v gelu

Pro separaci proteinů v gelu se typicky používá SDS-PAGE, která proteiny rozděluje na základě jejich velikosti (odpovídající molekulové hmotnosti) za denaturačních podmínek. V případě velkého množství proteinů ve vzorku, nemá tato metoda dostatečnou rozlišovací schopnost. Pro komplexnější vzorky je vhodné zvolit dvourozměrnou gelovou elektroforézu (2-DE), kdy SDS-PAGE předchází v prvním rozměru isoelektrická fokusace (IEF), která separuje proteiny podle jejich isoelektrického bodu. Pomocí 2-DE mohou být rozlišeny různé isoformy proteinu nebo různé PTM stejného proteinu (Camerini a Mauri, 2015). Alternativou 2-DE je dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza (2-D DIGE). Výhodou je výrazné snížení variability v důsledku separace dvou až tří proteinových vzorků v jednom gelu. Vzorky jsou značeny fluorescenčními barvivy Cy2, Cy3 a Cy5. Jedná se o deriváty *N*-hydroxysukcinimidu, které vytvářejí kovalentní vazbu s ϵ -aminoskupinou, přičemž neovlivňují mobilitu proteinů na 2-D gelu. Pomocí Cy2 může být značen interní standard, který je přidán do každého gelu a umožňuje automatickou softwarovou kvantifikaci. Metodou 2-D DIGE lze detegovat i 1 ng proteinu (Monteoliva a Albar, 2004). Oproti tomu nejpoužívanější metoda barvení Coomassie brilliantovou modří deteguje 25 ng většiny proteinů, v některých případech i 8 ng proteinu, avšak je to

metoda levná, snadná a umožňuje relativní kvantifikaci. Barvivo se váže na hydrofobní zbytky aminokyselin a uděluje proteinu modrou barvu. Proteiny lze kompletně odbarvit a analyzovat hmotnostní spektrometrií. Nejcitlivější kolorimetrickou metodou pro detekci proteinů je barvení stříbrem. Stříbrné ionty reagují s karboxylovou a sulfhydrylovou funkční skupinou, aminoskupinou a imidazolovým kruhem za vzniku stříbra. Stříbrným barvením lze detekovat až 0,5 ng proteinu, avšak je nutné stříbro z gelu před MS analýzou odstranit. Stejně citlivosti dosahuje barvení zinečnatými ionty v komplexu s imidazolem. Tento komplex vytváří ve všech částech gelu, kromě oblastí, ve kterých se nacházejí proteiny satureované dodecylsíránem sodným (SDS), bílou sraženinu. Zbarvení je možné snadno odstranit, a metoda je tak kompatibilní s MS analýzou (Baggerman *et al.*, 2005; Thermofisher.com).

Pro studium proteinových komplexů je třeba proteiny separovat za nativních podmínek. Schägger a von Jagow vyvinuli metodu „blue native PAGE“ (BN-PAGE) pro separaci mitochondriálních komplexů podílejících se na oxidativní fosforylaci. Uspořádání experimentu je stejné jako u SDS-PAGE. Pro udělení náboje a zvýšení rozpustnosti membránových proteinů se používá barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250 (Schägger a von Jagow, 1991; Abdallah *et al.*, 2012). Proteinové komplexy mohou být z gelu získány nativní extrakcí či nativním elektroblottingem. Nebo může následovat druhý rozměr separace v podobě SDS-PAGE, BN-PAGE nebo IEF následovaná SDS-PAGE (Wittig *et al.*, 2006) Byla také popsána BN-PAGE s nízkou koncentrací SDS pro šetrnou destabilizaci proteinových komplexů. Separace takto získaných podjednotek umožňuje získat informace o vnitřní struktuře velkých proteinových komplexů (Klodmann *et al.*, 2011).

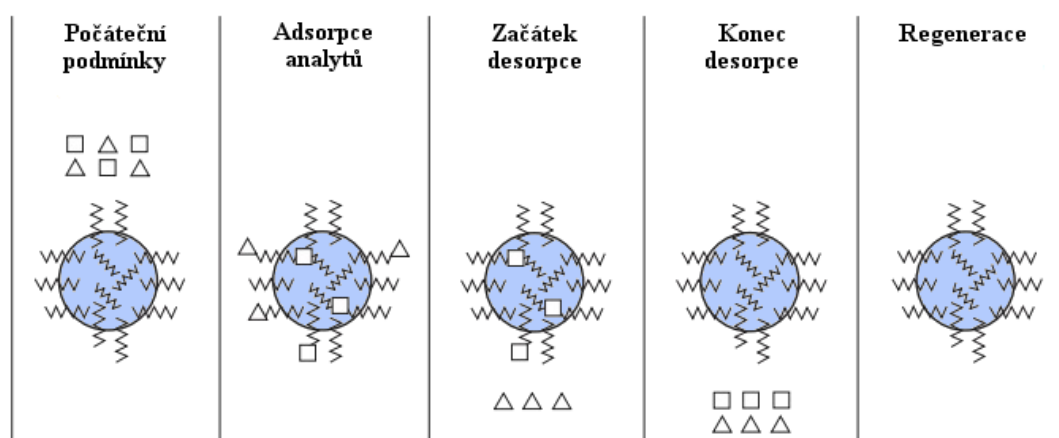
GB přístup k separaci proteinů či peptidů je sice levnější než GEF přístup, má ale jistá úskalí. Těmi jsou špatná rozpustnost membránových proteinů za podmínek vhodných pro IEF, diskriminace málo zastoupených proteinů ve směsi, horší rozlišení silně alkalických proteinů a špatná separace proteinů o větší molekulové hmotnosti než 250 kDa. Řešením je zdokonalování stávajících GB metod nebo doplnění GEF metodami (Chevalier, 2010).

2.3.2.2 Metody bez separace v gelu

Identifikace proteinů pomocí GEF přístupu zahrnuje separaci peptidů a současně „on-line“ nebo „off-line“ MS/MS analýzu (Camerini a Mauri, 2015). Pro GEF separace je v proteomice hojně využívána kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RPLC)

dále chromatografie vylučovací (SEC) nebo iontově výměnná (IEC), afinitní chromatografie (AC), chromatofokusace, či kombinace těchto metod označována jako technologie multidimensionální proteinové identifikace (MudPIT) (Jafari *et al.*, 2012). Součástí MudPIT bývá často také kapilární elektroforéza (CE). CE má vysokou rozlišovací schopnost a může být přímo spojena s MS (Camerini a Mauri, 2015).

RPLC je nejlepší chromatografická separační technologie peptidů a proteinů co se týče robustnosti, kapacity, dynamického rozsahu, rozlišení a reprodukovatelnosti (Lovrić, 2011). Peptidy jsou separovány podle jejich hydrofobnosti. Separace je založena na rozdělovacím koeficientu analytu mezi nepolární stacionární fázi a polární mobilní fázi, jejíž hydrofobnost v průběhu analýzy stoupá a zadržované peptidy postupně přestupují do mobilní fáze (Obr. 6) (Abdallah *et al.*, 2012). Stacionární fáze je, stejně jako v případě SEC a IEC, tvořena inertními částicemi. U RPLC je povrch částíček pokryt alifatickými řetězci obvykle C8 – C18. Hydrofobní části proteinů a peptidů interagují s alifatickými řetězci a tyto interakce zdržují peptidy či proteiny v koloně. IEC nemůže být kvůli přítomnosti iontů přímo spojena s MS, avšak bývá využívána jako předseparační krok RPLC. Stacionární fázi IEC jsou inertní částičky s imobilizovaným nábojem. V proteomice se obvykle jedná o silné katexy (Lovrić, 2011). Negativní funkční skupiny stacionární fáze atakují kladně nabitě peptidy při pH nižším než je jejich isoelektrický bod. Zvyšováním koncentrace soli jsou peptidy separovány podle náboje, zatímco postupným zvyšováním pH jsou separovány podle isoelektrického bodu a jedná se o chromatofokusaci (Abdallah *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2014). Eluce může probíhat gradientově nebo krokově. Kroková eluce je často volena při dvourozměrné chromatografii, kdy je každá frakce následně separována RPLC.



Obr. 6 Schéma znázorňující princip RPLC. Trojúhelník představuje více polární peptid, čtverec představuje méně polární peptid (převzato a upraveno dle Wolfson.huji.ac.il).

SEC je využívána k separaci proteinů za nativních nebo denaturujících podmínek. Obvykle je následována jinými separačními metodami. Částičky stacionární fáze obsahují póry, kterými prochází pouze malé proteiny, a proto jsou zpožděny oproti větším proteinům. SEC je vhodná pro odsolení vzorku či výměnu pufru (Lovrić, 2011).

Separaci proteinů a peptidů na základě specifické interakce s imobilizovaným ligandem umožňuje AC. Je využívána zejména pro zjednodušení vzorku a prekoncentraci analytu před 2-DE, může být součástí MudPIT, v mnoha případech je aplikována před MS analýzu bez předchozího dělení gelovou elektroforézou. AC je vhodná pro studium protein-proteinových komplexů a PTM, k lokalizaci buněčných komplexů (Lee a Lee, 2004). Varianta AC s imobilizovaným kovovým iontem je využívána pro purifikaci nativních proteinů, proteinů modifikovaných histidinovou kotvou (produkty genového inženýrství) a zejména fosfoproteinů (Wang *et al.*, 2013).

Ke GEF proteomice se mohou řadit také proteinové čipy. Metoda je založena na rozpoznání specifické protilátky imobilizované na destičce proteinem. Výhodou této metody je, že může probíhat analýza více vzorků současně a šetří tak čas, metoda je citlivá a vyžaduje malé množství vzorku. Na druhou stranu nebere v potaz možné PTM proteinů a je třeba znát proteiny, které jsou zkoumány. Proto je tento přístup vhodný pro klinickou diagnostiku (Camerini a Mauri, 2015).

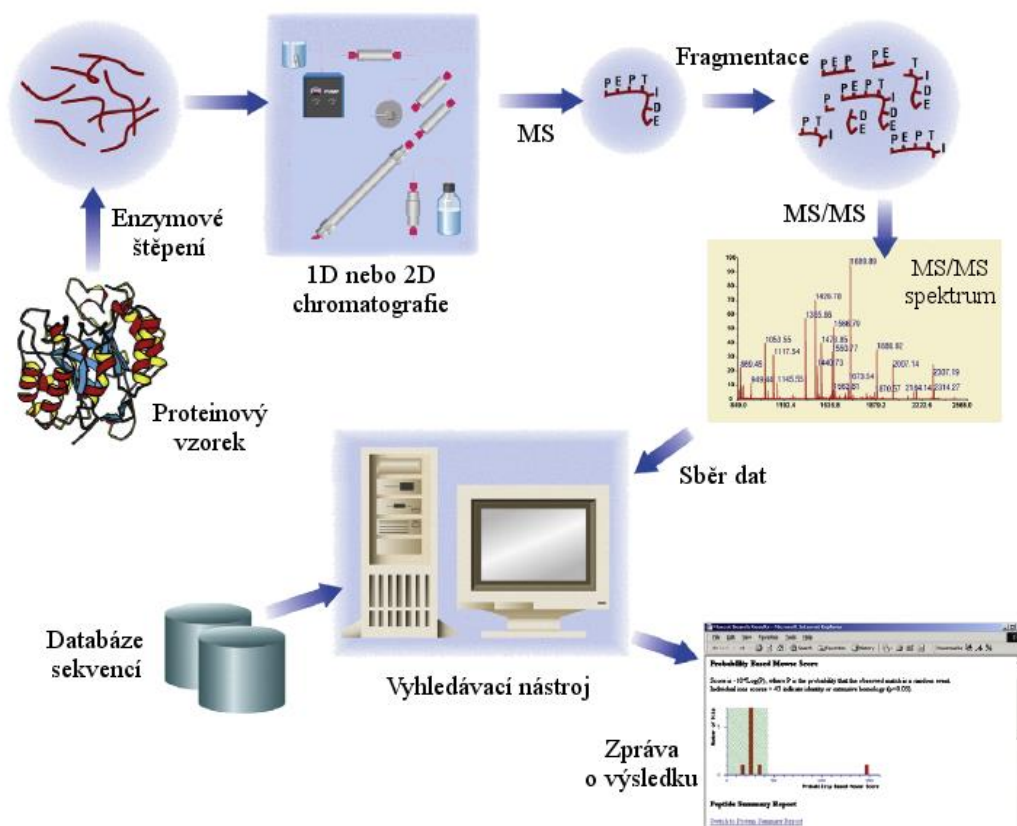
2.3.3 Hmotnostní spektrometrie v proteomice

Identifikace proteinů je založena na skutečnosti, že většina peptidových sekvencí o šesti a více aminokyselinách je do značné míry jedinečná v proteomu určitého organismu. Výjimkou jsou peptidy pocházející z konzervovaných oblastí příbuzných proteinů. Je-li možné získat sekvence několika peptidů jednoho genového produktu, zvyšuje se validita přiřazení ke genovému produktu z databáze. Pro identifikaci proteinu je tedy důležité jeho převedení na peptidy, získání sekvencí peptidů a nalezení odpovídající v databázi proteinových sekvencí. To je možné po správném změření hodnot m/z peptidů (Liebler, 2002).

V „top-down“ proteomice je purifikovaný protein analyzován hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením a proteinové ionty jsou fragmentovány přímo v hmotnostním analyzátoru. V „bottom-up“ proteomice je peptidová směs analyzována MS nebo MS/MS. Analýze často předchází separační krok (Lovrić, 2011).

Proteiny mohou být identifikovány metodou peptidového mapování („peptide mass fingerprinting“, PMF) Pokud je protein štěpen známým způsobem, hmotnosti vzniklých

peptidů tvoří typický vzor neboli otisk prstu v hmotnostním spektru. Stejným způsobem může být teoreticky štěpen každý protein přítomný v databázi. Identifikace probíhá porovnáváním měřených spekter s teoretickými spektry odvozenými od databázových sekvencí při znalosti principu štěpení proteinu (Henzel *et al.*, 2003) Nejužívanější webové nástroje k tomu sloužící jsou Aldente, Mascot, MS-Fit a Profound. Identifikace může být ztížena neočekávanými posttranslačními nebo chemickými modifikacemi, variantami sestřihu, individuálními změnami v sekvenci nebo nepřítomností proteinu v databázi (McHugh a Arthur, 2008). Pro účel PMF jsou obvykle izolovány jednotlivé proteiny, které jsou proteolyticky štěpeny, a následuje MS analýza. Velmi komplexní proteinové směsi jsou po proteolytickém štěpení podrobeny MS/MS analýze, která umožňuje identifikaci jednotlivých peptidů na základě určené sekvence (Lovrić, 2011). Soubor identifikovaných peptidů je poté využit k posouzení o jaký protein se jedná. Obvyklý postup experimentu, který využívá MS/MS data pro identifikaci proteinů je znázorněn na Obr. 7 (Cottrell, 2011).



Obr. 7 Schéma znázorňující typický experimentální postup při identifikaci a charakterizaci proteinu s využitím MS/MS dat (převzato a upraveno dle Cottrell, 2011).

Jeden z přístupů pro identifikaci peptidů pomocí MS/MS dat je „sequence tag“. Umožňuje identifikaci z MS/MS spekter, která jsou nekompletní, komplexní nebo špatně čitelná. Taková spektra obsahují krátké snadno identifikovatelné iontové série, ze kterých lze odvodit sekvenci o třech až čtyřech aminokyselinách, která slouží jako výchozí bod pro interpretaci. V případě, že jsou doplněny další informace jako hmotnost peptidu, hodnoty hmotností fragmentů, které obklopují známou sekvenci a specifičnost použitého enzymu, lze peptid jednoznačně identifikovat (Mann a Wilm, 1994; Cottrell, 2011). Pokud se protein nenachází v databázi, může být sekvencován „*de novo*“. Z MS/MS spekter jsou čteny celé peptidové sekvence. Hlavní myšlenkou je najít nejdelší možnou peptidovou sekvenci, která nejlépe odpovídá experimentálnímu spektru (Wang a Wilson, 2013). Nejrozšířenějším způsobem identifikace je prohledávání neinterpretovaných MS/MS dat proti databázi.

Spektra fragmentovaných peptidů spolu s informací o molekulové hmotnosti peptidu jsou využity pro vyhledávání v databázi. Nejpopulárnějšími prohledávacími nástroji jsou Mascot a Sequest (McHugh a Arthur, 2008).

Existují dvě hlavní úložiště pro databáze sekvencí. První spravuje Národní centrum pro biotechnologickou informaci (NCBI) v USA a druhé Evropský bioinformatický institut (EBI). Všechny prohledávací nástroje jsou schopné vyhledávat v databázích proteinových sekvencí, některé také v DNA nebo „expressed sequence tag“ (EST) databázích. Velmi kvalitní proteinovou databázi je Swiss-Prot. Obsahuje neopakující se sekvence, tedy shodnou sekvenci pro více variant proteinu, takže výsledkem může být méně identifikací, než je tomu u databází komplexních. Avšak prohledávání je rychlejší. Pro méně charakterizované organismy je lepší použití databází komplexních jako NCBI Inr nebo UniRef100. V případě neúspěšné identifikace je možné využít EST databáze, například EMBL EST divisions. Během prohledávání jsou DNA sekvence čteny ve všech šesti čtecích rámcích. Je vhodné je zvolit při studiu organismů, které nejsou zastoupeny v proteinových databázích (Cottrell, 2011; Matrixscience.com).

2.3.4 Identifikace biomarkerů metodami hmotnostní spektrometrie

Biomarker je látka často detekovatelná ve vyšším množství v krvi, moči, mozkomíšním moku či tkáni u pacientů s určitou chorobou. Choroba může být doprovázena změnami v methylaci DNA, polymorfismem jednoho nukleotidu, změnami v hladině mRNA, proteinu nebo metabolitu. Hledání biomarkerů pomocí MS je založeno na studiu proteinových změn. Vzorek patologické skupiny je porovnáván se vzorkem normální,

kontrolní skupiny s cílem určit rozdíly v proteinovém zastoupení a detekovat pravděpodobný biomarker (Veenstra a Yates, 2006).

Pro identifikaci biomarkerů metodami MS se obvykle užívá strategie založená na separaci, poté následuje MS detekce a identifikace, například 2-DE-MS, LC-MS, CE-MS. Analýza probíhá s i bez předchozího štěpení proteinů, používá se ionizace elektrosprejem (ESI) i ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) a různé typy analyzátorů (Veenstra a Yates, 2006; Tessitore *et al.*, 2013). Kromě zmíněných technik se ve výzkumu biomarkerů výrazně uplatnila metoda využívající desorpci analytu z obohaceného povrchu (SELDI) v kombinaci s analyzátozem doby letu (TOF). Využívá se proteinového čipu, jehož povrch je upraven tak, aby byly ze vzorku zachyceny jen určité proteiny. Tyto jsou pak analyzovány MS. Výhodou této metody je, že umožňuje analýzu stovek vzorků v relativně krátkém čase, nevýhodou je nemožnost měřit MS/MS spektra. Řešením je kombinace SELDI ionizace s hybridním kvadrupól-TOF analyzátozem (Isaaq *et al.*, 2002; Veenstra a Yates, 2006). Další metoda, která umožňuje relativně rychlou analýzu, využívá zachycení peptidů na magnetické kuličky, jejichž povrch je také speciálně upraven. Výhodou je možnost identifikace různými TOF-MS instrumenty (Veenstra a Yates, 2006). Schopnost analyzovat nativní materiál bez předchozí frakcionace je výhodou zobrazovací hmotnostní spektrometrie (IMS). Kromě identifikace mohou být vytvořeny mapy výskytu proteinu o určité hodnotě m/z ve tkáni. IMS využívá instrumentaci MALDI-MS. Tkáň je zmrazena a krájena na tenké plátky. Poté je umístěna na destičku a vysušena. Následuje aplikace matrice a MS analýza (Veenstra a Yates, 2006; McDonnell a Heeren, 2007).

2.4 Identifikace proteinů v moči

2.4.1 Moč jako zdroj markerových proteinů

Moč je pro klinické účely využívána stovky let. Oproti ostatním tělesným tekutinám může být odebírána neinvazivně v relativně velkém objemu i několikrát za den, přičemž není třeba školeného personálu. Může být tak využívána pro monitorování postupu nemoci nebo odpovědi na léčbu. Další výhodou moči je, že se jedná o velmi stabilní tělesnou tekutinu. Může být skladována několik let při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo tři dny při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i opakovaně zmrazována a močový proteom se v podstatě nezmění (Rodríguez-Suárez *et al.*, 2014).

Proteiny, které se v moči vyskytují, pochází buď z močového systému, nebo z plasmy. Mohou tak zprostředkovávat informace nejen o ledvinách a močovém traktu, ale také o vzdálených orgánech (Olszowy a Buszewski, 2014).

Hlavní charakteristikou biomarkeru je změna v jeho výskytu či kvantitě v souvislosti s fyziologickým nebo patofyziologickým procesem. V moči je možné tuto změnu zaznamenat a akumulovat, a je tak vhodným zdrojem biomarkerů. Oproti tomu v plasmě mohou být změny potlačeny homeostatickou regulací. Výsledky studie Li *et al.*, 2014 prokazují, že kvantitativní změny proteinů lze citlivěji detekovat v moči než v plasmě. Existují však výjimky. Například biomarkery akutních onemocnění, jako je nekrotizující pankreatitida nebo infarkt myokardu, jsou vylučovány do krve ve velkém množství v krátkém časovém úseku a je lepší detekovat je v plasmě (Gao, 2013; Li *et al.*, 2014).

Proteomická analýza moči se potýká s překážkami, jako jsou nízká koncentrace celkových proteinů v moči, vysoká koncentrace solí a jiných složek, které brání separaci proteinů a vysoká dynamika ve složení moči mezi jednotlivými odběry (Kalantari *et al.*, 2015). Močový proteom je ovlivněn pohlavím, věkem, životním stylem, ale také aktuálními fyziologickými faktory. Například zadržování sodíku a vody, kouření, podávání diuretik a antikoagulantů. Takové faktory mohou přispívat ke změnám močového proteomu a negativně ovlivňovat analýzu (Zhao *et al.*, 2015).

2.4.2 Analýza močového proteomu

Po dlouhá léta se předpokládalo, že moč neobsahuje dostatečné množství peptidů pro kvalitativní nebo kvantitativní analýzu. K rozvoji v oblasti analýzy močového proteomu došlo na začátku 21. století s využitím MS metod (Olszowy a Buszewski, 2014).

Pro studium močového proteomu se využívá téměř výhradně „bottom up“ přístupu. Spahr *et al.* (2001) identifikovali 124 proteinů z lyofilizované normální moči. Proteiny byly děleny 2-DE, po štěpení následovala LC-MS/MS analýza s využitím hybridního hmotnostního spektrometru s kvadrupólovým analyzátozem a analyzátozem doby letu (Q-TOF). Pieper *et al.* (2004) k přípravě vzorku použili imunodepleci abundančních proteinů. Identifikovali 420 proteinů pomocí MALDI-MS a LC-MS/MS s analyzátozem iontovou pastí. Srovnání metod acetonové precipitace a ultracentrifugace pro izolaci proteinů provedli Thongboonkerd *et al.* (2002). Následnou 2-DE a MALDI-TOF MS bylo identifikováno 28 unikátních proteinů izolovaných acetonovou precipitací a 19 unikátních proteinů izolovaných ultracentrifugací. Adachi *et al.* (2006) identifikovali

1543 proteinů v moči zdravých jedinců pomocí dvou hybridních hmotnostních spektrometrů: lineární iontové pasti s Fourierovou transformací a lineární iontové pasti s orbitrapem. Prokázali tak, že močový proteom je nečekaně komplexní a mohl by být užitečný ve výzkumu biomarkerů. Kentsis *et al.* (2009) užívali mnoho frakcionačních technik, a dokázali tak identifikovat až 2362 proteinů v moči. Hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením byl použit také ve studii Marimuthu *et al.* (2011), ve které bylo identifikováno 1823. Do této doby bylo známo nejméně 2500 různých proteinů, které byly identifikovány v moči metodami hmotnostní spektrometrie.

Zhao *et al.* (2015) předpověděl, že potenciálními biomarkery mohou být s větší pravděpodobností proteiny, které jsou stabilní složkou močového proteomu. Močový proteom zdravého jedince lze pomyslně rozdělit na část, která je shodná u všech jedinců, a část, která je do jisté míry individuální. Pokud biomarker patří k proteinům, které se běžně vyskytují v moči, je pro diagnostické účely nutné stanovit jeho kvantitativní změnu. Pokud se v moči běžně nevyskytuje případně pouze individuálně, může být diagnosticky hodnotné stanovení jeho přítomnosti či absence (Molina *et al.*, 2011).

V minulosti byly zkoumány biomarkery ve spojení s onemocněním ledvin: diabetickou nefropatií, IgA nefropatií, akutním poškozením ledvin, urolitiasou, lupusovou nefritidou obstrukcí ledvin, vezikoureterálním refluxem, odmítnutím transplantované ledviny a dalšími. Byly také určeny markerové proteiny rakoviny močového měchýře a prostaty a také některých vaskulárních chorob (Wu *et al.*, 2010; Rodríguez-Suárez *et al.*, 2014)

Pro zavedení biomarkeru do klinické praxe je nutná jeho validace. V minulosti se hmotnostně-spektrometrická zjištění validovala pomocí imunochemických testů jako ELISA nebo western blotting. Alternativou je užití techniky CE-MS, která je rychlá, robustní, citlivá s dobrou reprodukovatelností a relativně levná (Rodríguez-Suárez *et al.*, 2014).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Použité chemikálie

2-jodacetamid (Sigma-Chemie, Německo); 2-propanol (Merck, Německo); aceton (Merck, Německo); acetonitril (ACN, Merck, Německo); akrylamid/bisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA); β -merkptoethanol (Sigma-Aldrich, Německo); Coomassie briliantová modř R-250 (Bio-Rad, USA); dihydrogenfosforečnan amonný (Sigma-Aldrich, Německo); dithiotreitol (Bio-Rad, USA); dodecylsírán sodný (SDS, Serva, Německo); endoproteasa Glu-C (Sigma-Aldrich, USA); glycin (Sigma-Aldrich, Německo); hydrogenuhličitan amonný (AmBic, Sigma-Aldrich, USA); chlorid hořečnatý (Fluka, Švýcarsko); kyselina octová (Merck, Německo); kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA, Bruker Daltonik, Německo); kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, Německo); kyselina octová (Sigma-Aldrich, Německo); kyselina trifluorooctová (TFA; Merck, Německo); Laemmliho vzorkový pufr, 2x koncentrovaný (Sigma-Aldrich, USA); methanol (Merck, Německo); močovina (Sigma-Aldrich, USA); *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin (TEMED, Merck, Německo); Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonik, Německo); peroxidisírán amonný (Fluka, Švýcarsko); standard pro IEF, IEF mix 3,6-9,3 (Sigma-Aldrich, USA); standard pro SDS-PAGE, Low Range (Bio-Rad, USA); Tris-HCl (MP Biomedicals, Francie); Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA); trypsin rafinosovaný, připravil Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr., CRH PřF UP.

3.1.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytická kolona, 7 μ m x 150 mm, plněna částicemi Acclaim PepMap100 C18 o velikosti 2 μ m (Thermo Fisher Scientific, USA); centrifuga 5430R (Eppendorf, Německo); centrifuga Spectrafuge Mini (Labnet, Korea); centrifugační kyvety 250 ml; dialyzační celulosová membrána 43 mm (Sigma-Aldrich, USA); digestoř M 1500 (Merci, ČR); digitální předvážky Pioneer (Ohaus, USA); elektromagnetická míchačka C-MAG HS4 (IKA, Německo); držák na MALDI destičku MTP target frame III (Bruker Daltonik, Německo); hmotnostní spektrometr MALDI-TOF/TOF Ultraflex extreme (Bruker Daltonik, Německo); hmotnostní spektrometr maXis UHR-Q-TOF (Bruker Daltonik, Německo); kapalinový chromatograf Dionex Ultimate 3000 RSLC-nano liquid chromatograph (Thermo Fisher Scientific, USA) koncentrátor

vakuový Concentrator Plus (Eppendorf, Německo); MALDI destička MTP AnchorChip 800-384 TF (Bruker Daltonik, Německo); laminární box (Faster, Itálie); mikrostříkačka, 1 ml (Hamilton, USA); pipetové špičky ZipTip C18 (Merck Millipore, USA); předkolona Nano Trap, 100 μm x 20 mm, plněna částicemi Acclaim PepMap100 C18 o velikosti 5 μm (Thermo Fisher Scientific, USA); předkolona, 75 μm x 30 mm, plněna částicemi Reprosil GOLD 300 C18 o velikosti 5 μm (Dr. Maisch, Německo) sběrač proteinových frakcí Proteiner FCII (Bruker Daltonik, Německo); skener Umax U9908-HAR0 (Amersham Biosciences Corp., USA); termoblok Thermostat Plus (Eppendorf, Německo); termostatovaná třepačka Thermomixer Comfort (Eppendorf, Německo); třepačka KS 130 (IKA, Německo); třepačka vířivá Vortex Genius 3 (IKA, Německo); ultrazvuková čistička K-5LM (Kraintek, Slovensko); vialky se závitem, 1 ml (Waters, USA); vývěva Laboport (KNF, USA); zdroj pro elektroforézu EPS 600 (Pharmacia Biotech, Švédsko)

3.1.3 Biologický materiál

Pro experimenty byla použita moč samců laboratorních potkanů Sprague Dawley. Zvířata byla chována v metabolických klecích na Univerzitě Bicocca v Milánu, kde byla podrobena zákrokům a sběru moči. K dispozici byly vzorky moči prvního odběru: jednalo o sběr moči jeden týden před RD, jeden týden po RD a jeden týden po falešné RD. Zvířata podstoupila anestezii, laparotomii a denervaci. V případě falešné denervace podstoupila stejný zákrok, ale sympatické nervy nebyly přerušeny. Dále byl k dispozici druhý odběr moči. Jednalo se o vzorky moči odebrané jeden měsíc po RD či falešné RD. Bližší informace o stavu zvířat nebyly k dispozici.

Ve všech případech byla moč sbírána po 24 hodin, poté centrifugována (1200 g, 4 °C, 15 min) pro odstranění nečistot. Vzorky byly skladovány v objemu 8 - 12 ml při teplotě -20 °C.

3.1.4 Metody

3.1.4.1 Dialýza moči

Pro odstranění solí z moči před srážením proteinů byla provedena dialýza. Celulosová dialyzační membrána byla smáčena v deionizované vodě po 30 min. Poté byl několikrát promyt její vnitřní prostor deionizovanou vodou. Po aplikaci moči byla membrána uzavřena svorkami a zavěšena za okraj kádinky, ve které byl připraven 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

roztok AmBic. Objem tohoto roztoku byl asi 100 krát větší než objem dialyzované moči. Roztok byl po šesti hodinách vyměněn a dialýza pak probíhala ještě přes noc.

3.1.4.2 Srážení proteinů z moči

Moč či dialyzovaná byla srážena vychlazeným acetonem (-20 °C). Ke vzorkům moči byl přidán aceton v objemovém poměru 1:4 (moč:aceton). Vzorky byly ponechány při -20 °C 24 hodin. Poté centrifugovány (10000 g, 4 °C, 20 min).

3.1.4.3 Příprava vzorků pro SDS-PAGE a provedení separace

Precipitát byl zvážen a rozpuštěn v Laemmliho pufru 1:3,3 (w/v). Směs byla rozpipetována do zkumavek, ve kterých byla zahřívána 30 min na 37 °C a poté ještě 5 min na 100 °C. Po vychladnutí byly vzorky zmrazeny. Pro separaci močových proteinů metodou SDS-PAGE byl použit 4% w/v zaostřovací a 10% w/v dělicí gel (9 x 5,5 cm, tloušťka 1 mm pro nespojené vzorky; 13,5 x 8,5 cm, tloušťka 1,5 mm pro spojené vzorky). 10% w/v dělicí gel (9 x 5,5 cm) byl připraven smícháním 3,4 ml akrylamidu/bis-akrylamidu (30 % T, 3,3 % C), 2,5 ml 1,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 8,8), 3,8 ml vody, 100 μl 10% w/v SDS, 15 μl TEMED, 50 μl 10% w/v peroxidisíranu amonného. 4% w/v zaostřovací gel byl připraven smícháním 650 μl akrylamidu/bis-akrylamidu (30 % T, 3,3 % C), 1,25 ml Tris-HCl pufru (pH 6,8), 2,95 ml vody, 100 μl 10% w/v SDS, 15 μl TEMED, 60 μl 10% w/v peroxidisíranu amonného. Pro gel 13,5 x 8,5 cm bylo nutné objem roztoků zdvojnásobit. Vzorky byly před nanesením na gel zcentrifugovány (10000 g, 4 °C, 50 min). Pro separaci byl dále použit elektrodový pufr (25 mmol·l⁻¹ Tris, 192 mmol·l⁻¹ glycin, 0,1% w/v SDS, pH 8,3). Separace probíhala za stálého napětí 160 V (9 x 5,5 cm) nebo 150 V (13,5 x 8,5 cm). Hotový gel byl krátce opláchnut v deionizované vodě a poté barven roztokem Coomassie brilantové modři R-250. Pro odbarvení byl použit roztok s obsahem 7 % v/v kyseliny octové a 5 % v/v methanolu. Odbarvený gel byl skladován v deionizované vodě při 4 °C.

3.1.4.4 Příprava vzorků pro denaturační IEF a provedení separace

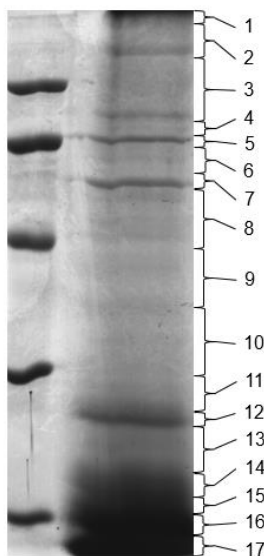
Acetonový precipitát byl rozpuštěn v lyzačním pufru (8 mol·l⁻¹ močovina, 2% v/v amfolyt, 2% v/v Triton X-100, 1% v/v β-merkptoethanol) v poměru 1:4 (w/v) a centrifugován (8000 g, 20 min). Vzorek byl připraven smísením 100 μl rozpuštěného precipitátu, 100 μl 50% v/v glycerolu a 10 μl amfolytu.

Proteiny byly děleny pomocí IEF v 7,5% w/v polyakrylamidovém gelu (9 x 7,5 cm; tloušťka 1 mm) v prostředí amfolytu pro pH gradient 3,6-9,3 (Robertson *et al.*, 1987). V průběhu separace bylo zvýšeno napětí. Separace probíhala 30 min při 150 V a poté ještě 2,5 hodiny při 200 V. Hotový gel byl 10 min jemně třepán v 10% v/v roztoku kyseliny trichloroctové, poté byl na několik hodin přemístěn do roztoku 1% v/v kyseliny trichloroctové pro odstranění amfolytů. Gel byl následně omyt deionizovanou vodou a barven Coomassie briliantovou modří R-250 (0,025% w/v Coomassie briliantová modř R-250, 40% v/v methanol, 7% v/v kyselina octová).

3.1.4.5 Příprava vzorků pro nativní IEF a provedení separace

Acetonový precipitát byl rozpuštěn v lyzačním pufru bez močoviny (DNase I reakční pufr [200 mmol·l⁻¹ Tris, pH 8.3, 20 mmol·l⁻¹ chlorid hořečnatý], 2% v/v amfolyt, 2% v/v Triton X-100, 1% v/v β-merkapt ethanol) v poměru 1:4 (w/v) a centrifugován (8000 g, 20 min). Vzorek byl připraven smísením 100 μl rozpuštěného precipitátu, 100 μl 50% v/v glycerolu a 10 μl amfolytu.

Proteiny byly děleny pomocí IEF v 7,5% w/v polyakrylamidovém gelu (9 x 7,5 cm; tloušťka 1 mm) v prostředí amfolytu pro pH gradient 3,3-9,3 (Robertson *et al.*, 1987). V průběhu separace bylo zvyšováno napětí. Separace probíhala 30 min při 150 V, 60 min při 200 V a 60 min při 400 V. Hotový gel byl omyt a barven stejně jako v případě denaturující IEF.



Obr. 8 Ukázka řezání gelu se vzorkem proteinů z moči separovaných SDS-PAGE. V pravém sloupci se nachází proteinový vzorek, v levém sloupci proteinový standard (shora 97,4; 66,2; 45,0; 31,0 a 21,5 kDa).

3.1.4.6 Štěpení proteinů v gelu a extrakce peptidů

Dráha separovaného vzorek v gelu byla rozřezána na sedmnáct po sobě jdoucích kusů (Obr. 8). Kusy gelu byly dále jednotlivě rozřezány na kostičky (1 mm^3) a přeneseny do mikrozkušavky. Kostičky v mikrozkušavkách byly promyty vodou, poté byly promývány roztokem $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AmBic/ACN 1:1 (v/v) až do odbarvení. Gelové kousky byly následně vysušeny nadbytkem ACN. Po odstranění ACN byl přidán roztok $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dithiotreitol/ $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AmBic pro redukci proteinů. Probíhala inkubace při $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 min, poté byla kapalina odstraněna a kousky opět vysušeny ACN. Vysušené gelové kostičky byly převrstveny roztokem $55 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ jodacetamid/ $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AmBic a inkubovány 20 min při pokojové teplotě ve tmě. Gelové kousky byly promyty $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AmBic. Kapalina byla nahrazena ACN. Gelové kousky byly rehydratovány v $50 \mu\text{l}$ $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ AmBic pufru, který obsahoval asi $1,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ rafinosovaný trypsin (Šebela *et al.*, 2006) nebo $1,7 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ endoproteasu Glu-C (EC 3.4.21.19) a ponechány při $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Po 40 min byla všechna kapalina odstraněna a nahrazena $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ AmBic pufrem. Mikrozkušavky byly přemístěny do termostatované třepačky a ponechány při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ přes noc pro štěpení proteinů. Pro extrakci peptidů bylo ke kapalině v mikrozkušavkách přidáno $150 \mu\text{l}$ roztoku $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AmBic/ACN 1:1 (v/v) a ponecháno při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ třepat 30 min. Poté byl supernatant odebrán do čisté mikrozkušavky a vysušen ve vakuovém koncentrátoru.

3.1.4.7 Odsolení peptidových vzorků

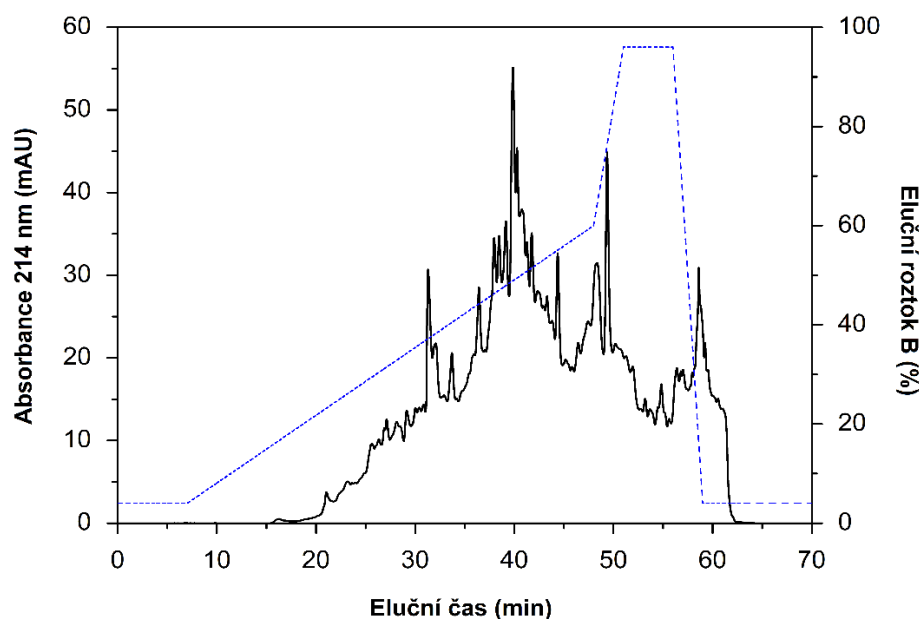
Pro odsolení peptidů byl odparek rozpuštěn v $15 \mu\text{l}$ $0,1\%$ v/v TFA sonikací po dobu 10 min. Samotné odsolení bylo provedeno pomocí ZipTip C18 pipetových špiček (Merck Millipore) následujícím způsobem. Sorbent byl nejprve zvlhčen $2 \times 10 \mu\text{l}$ roztoku $0,1\%$ TFA/ACN 1:1 (v/v). Následně byl sorbent ekvilibrován $2 \times 10 \mu\text{l}$ roztoku $0,1\%$ TFA. Poté bylo špičkou pomalu nasáváno a vypouštěno $15 \times 10 \mu\text{l}$ peptidového vzorku. Špička byla promyta $5 \times 10 \mu\text{l}$ roztoku $0,1\%$ TFA. Eluce peptidů probíhala pomalým nasáváním a vypouštěním roztoku $0,1\%$ TFA/ACN 1:3 (v/v) do čisté mikrozkušavky. Odsolené vzorky byly vysušeny ve vakuovém koncentrátoru.

3.1.4.8 Separace peptidů nanoLC a MALDI-TOF/TOF analýza

Odparek odsolených peptidů byl rozpuštěn v $15 \mu\text{l}$ $0,1\%$ v/v TFA a sonikován 10 min. Roztok byl poté převeden do skleněné vialky se závitem o objemu 1 ml. Separace probíhala na přístroji Dionex Ultimate 3000 RSLC-nano liquid chromatograph (Thermo

Fisher Scientific), který byl přímo spojen se sběračem peptidových frakcí Proteineer fcII (Bruker Daltonik). Pro analýzu bylo odebráno 5 μl vzorku a dávkováno na předkolonku Nano Trap (100 μm x 20 mm) pro zakoncentrování vzorku, průtok při dávkování vzorku byl 10 μl za min. Poté byl vzorek vymyt na analytickou kolonu (7 μm x 150 mm) pro separaci peptidů. Průtok mobilní fáze analytickou kolonou byl 300 nl za min. Předkolona i analytická kolona obsahovaly částice Acclaim PepMap100 C18 o velikosti 5 μm respektive 2 μm (Thermo Fisher Scientific). Celkový čas separace byl 70 min. Mobilní fáze A byl 0,05% vodný roztok TFA (v/v), mobilní fáze B obsahovala 0,05% TFA (v/v) v 80% ACN (v/v). Eluce peptidů byla gradientová: 0 min, 4 % B; 7 min, 4 % B; 48 min, 60 % B; 51 min, 96 % B; 56 min, 96 % B; 59 min, 4 % B; 70 min, 4 % B (Obr. 9). Eluát byl automaticky mísen s roztokem matrice (748 μl roztoku ACN:0,1% TFA 95:5 [v:v], 36 μl nasyceného roztoku CHCA v ACN:0,1% TFA 90:10 [v:v], 8 μl 10% [v/v] TFA, 8 μl 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dihydrogenfosforečnanu amonného) a dávkován na MALDI destičku v 17-s frakcích. Jeden vzorek byl rozdělen na 120 peptidových frakcí. Celkový objem jedné frakce byl 420 nl. Peptidový standard byl na MALDI destičku nanesen manuálně. 2 μl roztoku standardu (Peptide Calibration Standard II) rozpuštěný ve 125 μl ACN:0,1% TFA 30:70 [v:v]) bylo smíšeno s 300 μl roztoku matrice (748 μl roztoku ACN:0,1% TFA 85:15 [v:v], 36 μl nasyceného roztoku CHCA v ACN:0,1% TFA 90:10 [v:v], 8 μl 10% TFA [v/v], 8 μl 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dihydrogenfosforečnanu amonného), na destičku bylo nanášeno 0,5 μl tohoto roztoku. Chromatograf a sběrač peptidových frakcí byl ovládán softwarem Chromeleon Xpress (Thermo Scientific) a HyStar 3.2 (Bruker Daltonik).

Peptidové frakce byly následně analyzovány hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF/TOF. Bylo využito přístroje Ultraflextreme (Bruker Daltonik), který byl vybaven LIFT celou a 2-kHz Smartbeam-II laserem. Všechna spektra byla měřena v pozitivním módu (1+). Před začátkem měření byla nakalibrována pozice destičky v přístroji. Přístroj byl kalibrován externě s využitím směsi standardů Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonik). MS spektra byla měřena v rozmezí 500-4000 m/z . Desorpce analytu byla umožněna 2500 laserovými pulsy. Urychlovací napětí v iontovém zdroji bylo nastaveno na 25 kV, pro MS/MS spektra 7,5 kV, na LIFT celou bylo pak aplikováno napětí 19 kV. Pro měření MS/MS spekter mohlo být vybráno maximálně 10 prekurzorů z jedné peptidové frakce, poměr signálu a šumu > 20. Přístroj byl ovládán programy WarpLC 1.3 a FlexControl 3.4 (Bruker Daltonik).



Obr. 9 Ukázka chromatogramu nanoLC separace směsi peptidů. Černě vyznačen záznam z UV/VIS detektoru při 214 nm. Modře vyznačen průběh gradientu elučního roztoku B.

3.1.4.9 Separace peptidů nanoLC a ESI-Q-TOF analýza

Odparek odsolených peptidů byl rozpuštěn v 15 μl 0,1% v/v TFA a sonikován 10 min. Roztok byl poté převeden do skleněné vialky se závitem o objemu 1 ml. Separace probíhala na přístroji Dionex Ultimate 3000 RSLC-nano liquid chromatograph (Thermo Fisher Scientific), který byl přímo spojen s hmotnostním spektrometrem maXis UHR-Q-TOF (Bruker Daltonik). Pro analýzu bylo odebráno 5 μl vzorku a dávkováno na předkolonku (75 μm x 30 mm) s částicemi C18 Reprosil GOLD 300 5 μm (Dr. Maisch). Zachycené peptidy byly nejprve promývány roztokem 2% v/v kyseliny mravenčí při průtoku 3 μl za minutu po dobu 7 minut, poté byly vymyty na analytickou kolonu (75 μm x 150 mm) s částicemi C18 Reprosil GOLD 3 μm (Dr. Maisch). Mobilní fáze A byl 0,4% vodný roztok kyseliny mravenčí (v/v), mobilní fáze B obsahovala 0,4% kyselinu mravenčí (v/v) v 90% ACN (v/v). Eluce peptidů byla gradientová: 0 min, 8 % B; 7 min, 8 % B; 18 min, 11 % B; 21 min, 15 % B; 36 min, 32 % B; 37 min, 85 % B; 40 min, 85 % B; 43 min, 8 % B; 60 min, 8 % B. Eluované peptidy byly ionizovány elektrosprejem. Napětí na kapiláře bylo nastaveno na 2150 V. MS spektra byla měřena v rozmezí 100-1600 m/z s dobou sběru 300 ms. Pro fragmentaci byla užitá technika založená na kolizi iontů s inertním plynem. Pro měření MS/MS spekter mohly být vybrány maximálně 4 prekurzorové ionty. MS/MS fragmentační spektra byla sbírána po dobu 200-400 ms v závislosti na intenzitě zvoleného prekurzoru.

3.1.4.10 Zpracování dat

Získaná data byla prohledávána proti databázi Swiss-Prot. Bylo využito nástroje Mascot 1.0 (Matrix Science). U analýzy MALDI-TOF/TOF bylo prohledávání omezeno na potkaní proteiny „*Rattus*“ nebo nebylo omezeno. Dalšími parametry pro vyhledávání byly specifická proteolytického enzymu: „semiTR“ v případě štěpení trypsinem, „V8-DE“ v případě štěpení endoproteasou Glu-C; až dvě vynechaná štěpná místa; fixní modifikace: karbamidomethylace cysteinu; variabilní modifikace: oxidace methioninu. Tolerance hmotnosti prekurzorového iontu stanovena na 25,0 ppm, pro fragmentové ionty pak 0,5 Da. Náboj peptidů byl +1. Minimální Mascot skóre pro protein bylo 40. U analýzy ESI-Q-TOF bylo prohledávání omezeno na potkaní proteiny „*Rattus*“, specifická proteolytického enzymu nastavena na „semiTR“ s možným vynecháním dvou štěpných míst. Fixní modifikace: karbamidomethylace cysteinu, variabilní modifikace: acetylace *N*-konce proteinů a oxidace methioninu. Minimální Mascot skóre pro protein bylo 30. Tolerance hmotnosti prekurzorového iontu byla 4,0 ppm, pro fragmentové ionty 0,025 Da. Náboj peptidů byl +1, +2 nebo +3.

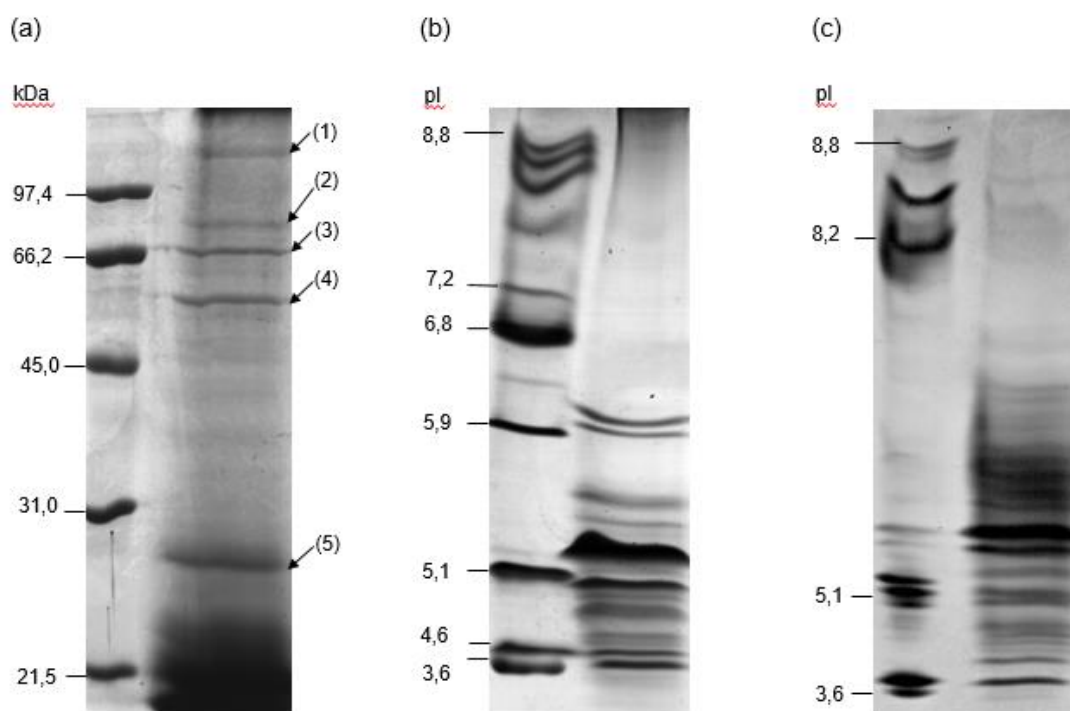
3.1.4.11 Vyhodnocení dat

Zařazení identifikovaných proteinů do skupin podle termínů genové ontologie (GO) bylo provedeno pomocí webového nástroje pro funkční klasifikaci genů DAVID (Huang *et al.*, 2009) (<https://david.ncifcrf.gov>). Informace o vlastnostech proteinů, jejich lokalizaci v buňce a biologickém procesu byly získány z databáze UniProtKB (<http://www.uniprot.org>). Informace o výskytu proteinů v ledvinách byly získány z databáze Kidney and urinary pathway knowledge base (<http://www.kupkb.org/>). Informace o výskytu proteinů v plasmě byly získány z databáze Plasma proteome database (<http://www.plasmaproteomedatabase.org>).

4 VÝSLEDKY

4.1 Výběr vhodné metody pro separaci proteinů

Pro výběr metody vhodné pro separaci proteinů byly k dispozici vzorky blíže nespecifikované moči laboratorních potkanů. Proteiny byly ze vzorku moči získány acetonovou precipitací. Před proteolytickým štěpením byly proteiny separovány SDS-PAGE (Obr. 10a), nativní IEF (Obr. 10b) nebo denaturační IEF (Obr. 10c). Pro štěpení proteinů v gelu byl zvolen trypsin. Po chromatografické separaci peptidů byly proteiny identifikovány hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF/TOF. Při využití metody SDS-PAGE pro separaci proteinů bylo ve vzorku identifikováno 31 proteinů. Zatímco při využití nativní a denaturační IEF bylo identifikováno 11 respektive 18 proteinů (Tab. 5, Příloha 1). Ačkoli na gelu po SDS-PAGE proteiny nejsou ideálně zaostřeny, bylo tímto postupem identifikováno více proteinů ve srovnání s ostatními užitými metodami.



Obr. 10 Separace proteinů SDS-PAGE (a), nativní IEF (b) a denaturační IEF (c). V pravém sloupci se nachází vždy proteinový vzorek (přibližně 30 μg proteinu), v levém sloupci se nachází proteinový standard (přibližně 2 μg proteinu).

Na fotografii gelu po separaci proteinů metodou SDS-PAGE (Obr. 10a) lze rozlišit 5 výrazně barvených pásů. Ačkoli v odpovídajících částech gelu bylo identifikováno více proteinů, podle molekulové hmotnosti proteinu lze usoudit, který protein se v daném místě pravděpodobně vyskytuje. Pro-epidermální růstový faktor (1) je membránový protein, který se v ledvinách uplatňuje při vstřebávání hořčíku v distálním tubulu. Meprin A, α podjednotka (2) se do moči dostal nejspíš také z ledvin, nachází se běžně v proximálním tubulu juxtamedulárních nefronů. Albumin (3) a pankreatická α -amylasa (4) jsou sérové proteiny (UniProtKB). V oblasti (5) byl identifikován zejména hlavní močový protein, doprovázený močovým proteinem 1 a močovým proteinem 2, které se rovněž nachází na gelu v oblasti nižších molekulových hmotností spolu s močovým proteinem 3, cystatinem C a řetězci imunoglobulinů. Proteiny s molekulovou hmotností menší než 30 kDa pronikají do ultrafiltrátu téměř bez omezení (Tesař *et al.*, 2006), pravděpodobně proto byly ve vzorku hojně přítomny a nejsou na gelu rozlišeny.

Proteiny identifikované po zpracování jednotlivých gelů byly mezi sebou porovnány. Bylo zjištěno, že při použití nativní IEF i denaturační IEF pro separaci proteinů, byl v každém vzorku identifikován pouze jeden protein, který nebyl identifikován ve vzorku po separaci proteinů SDS-PAGE. Jednalo se o neurofibromin v případě nativní IEF a o probasin v případě denaturační IEF.

Metoda SDS-PAGE se pro separaci močových proteinů před proteolytickým štěpením jevila na základě počtu identifikovaných proteinů jako nejvhodnější, proto byla pro separaci proteinů využita v dalších experimentech.

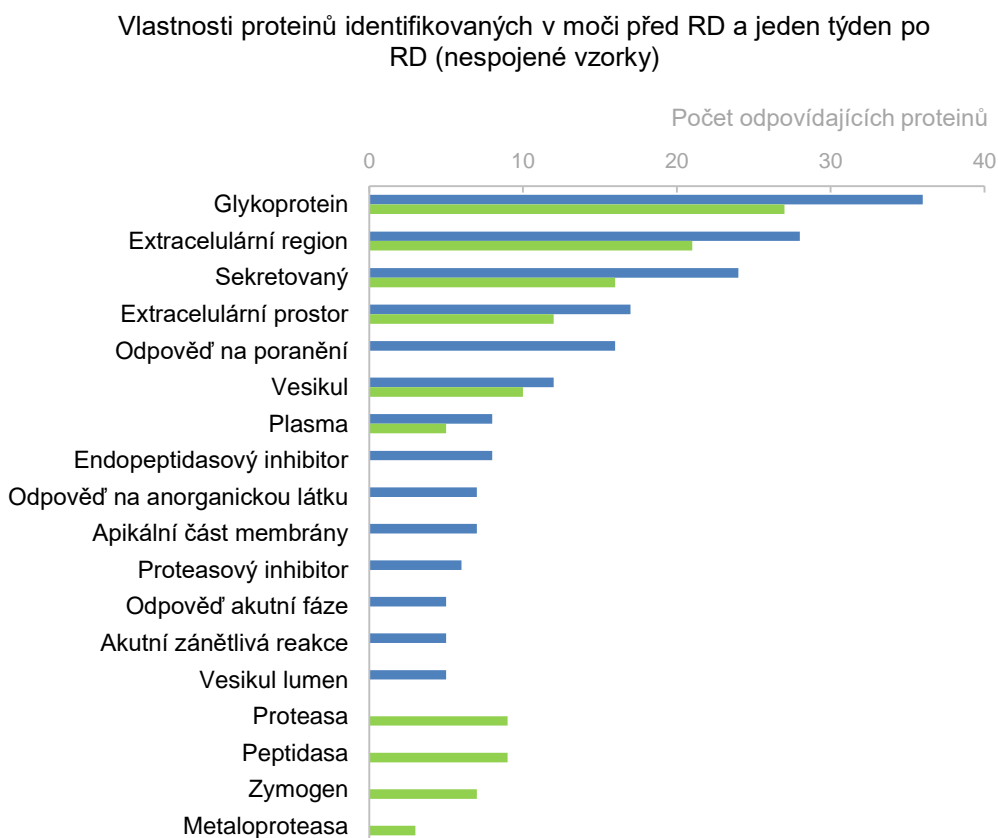
4.2 Výběr vhodné proteasy pro štěpení proteinů

Proteiny získané srážením ze vzorku moči jednoho zvířete před RD a jeden týden po RD, byly separovány SDS-PAGE. Gel byl zpracován ve dvou sériích. V první sérii byly proteiny štěpeny trypsinem, ve druhé sérii byly štěpeny endoproteasou Glu-C. Proteiny obou sérií byly posléze identifikovány hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF/TOF. Počty identifikovaných proteinů v obou sériích jsou uvedeny v Tab 1. Kompletní seznam identifikovaných proteinů je uveden v Tab. 6, Příloze 2.

Tab. 1 Počet identifikovaných proteinů ve vzorcích před RD a jeden týden po RD pro použité proteolytické enzymy.

Enzym	Před RD	Po RD (1 týden)
Trypsin	50	36
Glu-C	10	9

Proteiny identifikované po štěpení trypsinem a endoproteasou Glu-C byly mezi sebou porovnány. Bylo zjištěno, že všechny proteiny, které byly identifikovány ve vzorku před RD po štěpení endoproteasou Glu-C, byly rovněž identifikovány ve stejném vzorku po štěpení trypsinem. Ve vzorku odebraném jeden týden po RD byl po štěpení endoproteasou Glu-C identifikován pouze jeden protein (T-kinogen 1), který nebyl identifikován také v případě štěpení trypsinem. Vzhledem k vyššímu počtu identifikací při použití trypsinu pro proteolytické štěpení, se enzym jeví jako vhodnější pro identifikaci proteinů z moči.



Obr. 11 Grafické zpracování identifikovaných proteinů ze série štěpení proteinů trypsinem ve vzorcích před RD (modře) a jeden týden po RD (zeleně) podle převládajících termínů GO. Hodnota $P < E^{-5}$.

Na Obr. 11 jsou uvedeny vlastnosti proteinů identifikovaných ve vzorcích ze série po štěpení proteinů trypsinem, které byly získány analýzou souboru proteinů pomocí webového nástroje pro funkční klasifikaci genů DAVID, který umožňuje přiřazení proteinů k termínům GO podle funkčních charakteristik proteinů. GO termíny jsou poté seřazeny se statistickým vyhodnocením (P hodnota) (Huang *et al.*, 2009).

4.3 Analýza vzorků moči prvního odběru

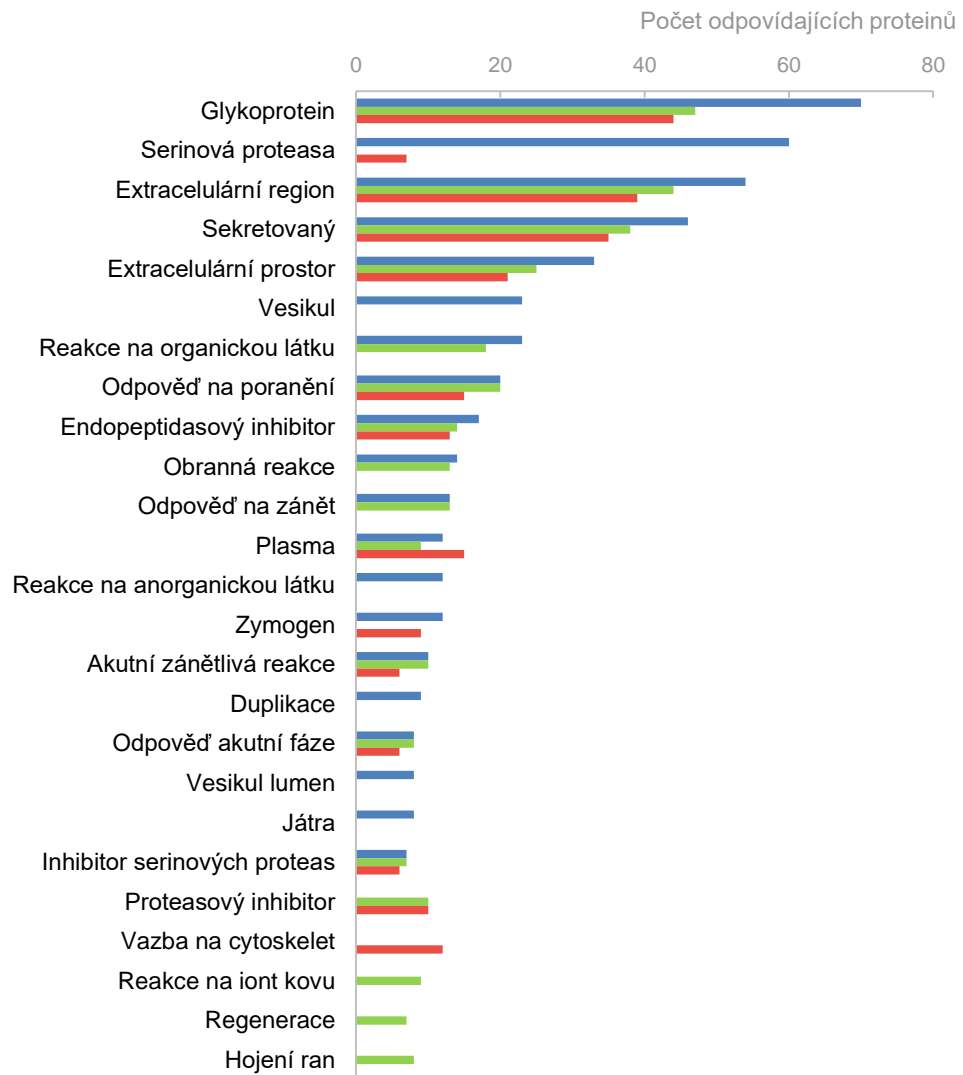
Pro analýzu moči prvního odběru byly spojeny vzorky moči více pokusných zvířat. Proteiny získané ze vzorku moči před RD, jeden týden po RD a jeden týden po falešné RD byly separovány SDS-PAGE, štěpeny trypsinem v gelu a posléze identifikovány hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF/TOF. Kvůli nízkému počtu identifikovaných proteinů byly stejné peptidové vzorky následně analyzovány hmotnostním spektrometrem s vyšším rozlišením a ionizací elektrosprejem ESI-Q-TOF. Počty identifikovaných proteinů pro obě metody jsou uvedeny v Tab. 2. Seznam všech identifikovaných proteinů je uveden v Tab. 7, Příloze 3.

Proteiny identifikované metodou MALDI-TOF/TOF byly v odpovídajících vzorcích identifikovány rovněž metodou ESI-Q-TOF, pouze jeden protein byl unikátně identifikován analýzou MALDI-TOF/TOF. Všechny identifikované proteiny byly zpracovány pomocí webového nástroje pro funkční klasifikaci genů DAVID (Obr. 12) (Huang *et al.*, 2009). Proteiny identifikované ve vzorku po RD byly porovnány s těmi, které byly identifikovány ve vzorku moči po falešné RD a poté s proteiny ve vzorku moči před RD. Bylo identifikováno 16 proteinů unikátních pro vzorek moči odebraný jeden týden po RD. Tyto proteiny jsou uvedeny v Tab. 3, kde je rovněž uveden výskyt proteinů v ledvinách a plasmě zdravých jedinců, lokalizace proteinu v buňce a biologický proces, kterého se účastní.

Tab. 2 Počet proteinů identifikovaných ve spojených vzorcích metodami MALDI-TOF/TOF a ESI-Q-TOF.

Metoda	Před RD	Po RD (1 týden)	Po falešné RD (1 týden)
MALDI-TOF/TOF	18	19	8
ESI-Q-TOF	135	97	97

Vlastnosti proteinů identifikovaných v moči před RD a jeden týden po RD a po falešné RD (spojené vzorky)



Obr. 12 Grafické zpracování identifikovaných proteinů ve vzorcích odebraných jeden týden před RD (modře), jeden týden po RD (zeleně) a jeden týden po falešné RD (červeně) podle převládajících termínů GO. Hodnota $P < E^{-5}$.

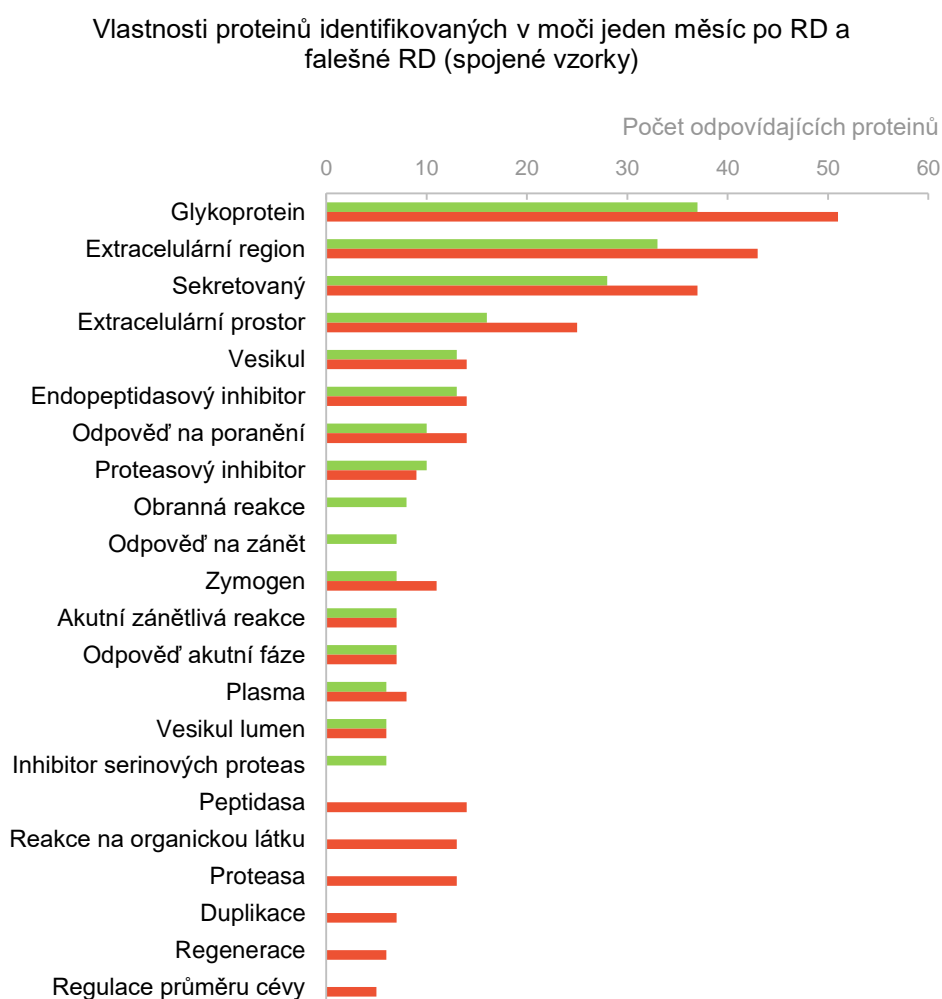
Tab. 3 Seznam proteinů identifikovaných pouze ve vzorku odebraného jeden týden po RD.

Metoda	Identifikační zkratka	Název proteinu	Ledviny (potkan)	Ledviny (člověk)	Plasma (člověk)	Lokalizace v buňce	Biologický proces
E	CK5P1_RAT	CDK5 regulatory subunit-associated protein 1	+	N	N	C	Buněčná proliferace, regulace diferenciace neuronů
E	EF1A1_RAT	Elongation factor 1-alpha 1	+	+	N	J, C	Biosyntéza proteinů
E	FETUB_RAT	Fetuin-B	-	N	+	EC	Oplodnění
E	HEM6_RAT	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	N	N	N	MT	Biosyntéza hemu, reakce na anorg. látku
E	IF5A1_RAT	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	+	+	N	J, C, ER	Biosyntéza proteinů
E	IGG2B_RAT	Ig gamma-2B chain C region	N	N	N	Vnější strana PM	Imunitní reakce
E	IGHG1_RAT	Ig gamma-1 chain C region	N	N	+	Vnější strana PM	Imunitní reakce
E	KPYM_RAT	Pyruvate kinase PKM	N	N	N	J, C	Glykolýza, regenerace
E	MFA3L_RAT	Microfibrillar-associated protein 3-like	+	+	N	J, C, PM	Neklasifikován
E	NCBP1_RAT	Nuclear cap-binding protein subunit 1	+	+	+	J, C	Regulace iniciace translace
E	PAR6A_RAT	Partitioning defective 6 homolog alpha	+	+	N	C, BM	Buněčné dělení
E	REG3G_RAT	Regenerating islet-derived protein 3-gamma	-	N	N	C, EC	Akutní fáze, odpověď na zánět
E	SMAG1_RAT	Protein Smaug homolog 1	N	N	N	C	Regulace translace
E	TBA1C_RAT	Tubulin alpha-1C chain	+	+	N	CT	Strukturní složka cytoskeletu
M	TFF3_RAT	Trefoil factor 3	+	+	+	EC	Hojení ran
E	ZHX1_RAT	Zinc fingers and homeoboxes protein 1	+	N	+	J	Regulace transkripce

(BM) buněčná membrána, (C) cytoplasma, (CT) cytoskelet, (E) ESI-Q-TOF, (EC) extracelulární, (ER) endoplasmatické retikulum, (J) jádro, (M) MALDI-TOF/TOF, (MT) mitochondrie, (N) nebyl prokázán, (PM) plasmatická membrána, (+) přítomen, (-) nepřítomen.

4.4 Analýza vzorků moči druhého odběru

Druhý odběr moči představovaly vzorky získané jeden měsíc po RD či falešné RD. Proteiny byly sráženy ze spojených vzorků více pokusných jedinců. Precipitaci proteinů z moči předcházela dialyzační krok. Dialýzou moči byly odstraněny látky, které rušily separaci proteinů před proteolytickým štěpením, především soli. Precipitované proteiny byly separovány SDS-PAGE a identifikovány hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF/TOF po štěpení proteinových frakcí v gelu trypsinem. Ve vzorku moči denervovaných jedinců bylo identifikováno 51 proteinů, ve vzorku moči falešně denervovaných jedinců bylo identifikováno 71 proteinů. Proteiny identifikované v tomto experimentu jsou uvedeny v Tab. 8, Příloze 4. Identifikované proteiny zpracované pro zjištění převládajících GO termínů jsou graficky zpracovány na Obr. 13.



Obr. 13 Grafické zpracování identifikovaných proteinů ve vzorcích odebraných jeden měsíc po RD (zeleně) a po falešné RD (červeně) podle převládajících termínů GO. Hodnota $P < E^{-5}$.

Proteiny identifikované ve vzorku moči odebraném jeden měsíc po RD byly porovnány s proteiny identifikovanými ve vzorku odebraném ve stejném časovém intervalu falešně denervovaným jedincům a dále s proteiny identifikovanými ve vzorku moči před RD. Výsledkem byly 4 proteiny unikátně identifikované ve vzorku moči denervovaných jedinců jeden měsíc po zákroku. Tyto proteiny jsou s informacemi o jejich výskytu, lokalizaci v buňce a biologickém procesu, ve kterém se uplatňují, uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4 Seznam proteinů identifikovaných pouze ve vzorku moči odebraného jeden měsíc po RD.

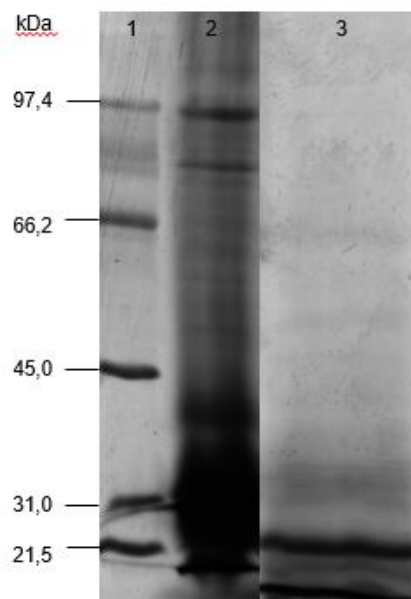
Metoda	Identifikační zkratka	Název proteinu	Ledviny (potkan)	Ledviny (člověk)	Plasma (člověk)	Lokalizace v buňce	Biologický proces
M	NGAL_RAT	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	+	+	N	EC	Apoptóza, transport, vrozená imunita
M	OBP_RAT	Odorant-binding protein	+	N	N	EC	Transport, čich
M	PER3_RAT	Period circadian protein homolog 3	+	N	+	J, C	Biologické rytmy, regulace transkripce
M	REG3G_RAT	Regenerating islet-derived protein 3-gamma	-	N	N	C, EC	Akutní fáze, odpověď na zánět

(C) cytoplasma, (EC) extracelulární, (J) jádro, (M) MALDI-TOF/TOF, (N) nebyl prokázán, (PM) plasmatická membrána, (+) přítomen, (-) nepřítomen.

5 DISKUZE

Výběr metody pro přípravu vzorku je v analýze močového proteomu rozhodující. Stěžejní je výběr vhodného postupu pro zkoncentrování proteinů zejména u GB metod (Thongboonkerd *et al.*, 2004). Užití různých metod pro koncentrování či izolaci proteinů z moči přináší různé výsledky při jejich separaci 2-DE. Podle Thongboonkerd (2007) bylo většího počtu vizualizovaných proteinových bodů dosaženo po srážení proteinů acetonitrem, methanolem, ethanolem či acetonem oproti srážení proteinů chloroformem, síranem amonným, kyselinou octovou (vše 75%), ultracentrifugací či lyofilizací. Thongboonkerd *et al.* (2002) izolovali proteiny z moči ultracentrifugací a srážením 50% acetonem. Zjistili, že ultracentrifugací je možné izolovat více bazické proteiny, zatímco acetonovou precipitací se lépe izolují proteiny s nižším *pI*. V této práci byl použit pro srážení proteinů 80% aceton, byly identifikovány proteiny s hodnotami *pI* v rozmezí 4 – 12.

Ačkoli srážení proteinů přispívá k odstranění kontaminantů, velmi vhodným krokem pro přípravu vzorků se zdá být dialýza moči provedená před proteinovou precipitací. V moči se nachází velké množství solí, lipidů a glykosaminoglykanů, které mohou zůstat v proteinovém precipitátu a rušit separaci proteinů v gelu (Thongboonkerd *et al.*, 2006). Thongboonkerd *et al.* (2006) zaznamenali lepší rozlišení proteinových bodů v gelu po separaci proteinů 2-DE z dialyzovaných vzorků. V této práci byly proteiny srážené z nedialyzované a dialyzované moči děleny SDS-PAGE. Rozlišení proteinových pásů v gelu bylo u dialyzovaných vzorků znatelně lepší, koncentrace proteinů v Laemmliho pufru byla patrně vyšší (Obr. 14) a také počet identifikovaných proteinů MALDI-TOF/TOF MS vzrostl u dialyzovaných vzorků nejméně 2,5 krát.



Obr. 14 Fotografie gelu po SDS-PAGE. 1 - proteinový standard (5 μg proteinu), 2 - dialyzovaný vzorek (20 μl roztoku precipitátu rozpuštěného v Laemmliho pufru), 3 - nedialyzovaný vzorek (80 μl roztoku precipitátu rozpuštěného v Laemmliho pufru).

Metoda, která je vhodná pro separaci proteinů před proteolytickým štěpením, byla vybrána na základě nejvyššího počtu identifikovaných proteinů ve vzorku z ověřovacích experimentů. Jednalo se o SDS-PAGE s 10% polyakrylamidovým separačním gelem. Jelikož proteiny větší než 150 kDa za fyziologických okolností přes glomerulární filtrační bariéru nepronikají (Tesař *et al.*, 2006), proteiny o vyšší molekulové hmotnosti než má albumin (69 kDa) mohou pronikat do ultrafiltrátu omezeně a proteiny s molekulovou hmotností menší než albumin do ultrafiltrátu pronikají (Raila *et al.*, 2005), může být SDS-PAGE s 10% separačním gelem vhodně použita pro separaci proteinů z moči. Experimentálně se touto metodou podařilo na gelu separovat a následně identifikovat proteiny s molekulovými hmotnostmi v rozmezí od 11 do 163 kDa. Identifikovány byly také proteiny „fibronectin“ (272 kDa) nebo „low-density lipoprotein receptor-related protein 2“ (519 kDa).

Kromě trypsinu, který je téměř výhradně využíván ke štěpení proteinů na peptidy v proteomických studiích založených na MS analýze (Olsen *et al.*, 2004), byla pro štěpení proteinů v gelu použita také endoproteasa Glu-C. Swaney *et al.* (2010) ve své studii uvádějí, že pro zvýšení počtu identifikovaných proteinů je vhodnější provést stejný experiment s využitím různých proteas, než opakování v replikátech. V experimentu provedeném v této práci bylo ve vzorku po štěpení proteinů endoproteasou Glu-C identifikováno až 5 krát méně proteinů, než ve stejném vzorku,

u kterého byl použit trypsin jako proteolytický enzym a byl identifikován pouze jeden unikátní protein. Příčinou mohly být příliš velké peptidy, které vznikly po štěpení proteinů endoproteasou Glu-C v bikarbonátovém pufru, ve kterém dochází ke štěpení sekvence pouze za kyselinou glutamovou (Engel *et al.*, 2006) ale také omezená difuze endoproteasy Glu-C do gelu kvůli větší molekulové hmotnosti. Molekulová hmotnost použité endoproteasy Glu-C je 29 kDa (Sigmaaldrich.com), zatímco rafinosovaného trypsinu 26 kDa (Šebela *et al.*, 2006).

Na identifikaci proteinů ze spojených vzorků není vždy nahlíženo kladně. Podle Thongboonkerd (2007) by výsledky analýzy spojených vzorků moči, měly být následně potvrzeny analýzou individuálních vzorků, jelikož spojením vzorků může dojít ke ztrátě informací intra-individuální či inter-individuální variability (Thongboonkerd, 2007), avšak mohl by být sledován trend. Adachi *et al.* (2006) dokázali identifikovat ze vzorku moči jedince 1282 proteinů. Ze spojených vzorků stejného jedince identifikovali celkem 1055 proteinů, z toho 261 z nich bylo unikátních. V této práci bylo ve vzorku jedince před RD identifikováno 50 proteinů, jeden týden po RD 36 proteinů (Tab. 1), ve spojených vzorcích moči více jedinců bylo identifikováno 18 respektive 19 proteinů (Tab. 2). Při porovnání proteinů odpovídajících vzorků bylo zjištěno, že ačkoli bylo ve spojených vzorcích identifikováno méně proteinů, byly identifikovány 2 respektive 5 proteinů, které ve vzorku jedince nebyly identifikovány. Lze tedy říci, že spojení vzorků moči pravděpodobně snižuje počet identifikovaných proteinů a některé proteiny identifikované v individuálním vzorku jsou ignorovány, ale umožňuje také identifikaci proteinů jiných.

Doposud bylo publikováno spoustu studií, které prokazují snížení krevního tlaku po zákroku RD bez významných vedlejších účinků (Huan a Cohen, 2013), avšak nebyly zkoumány změny močového proteomu, které by mohly přinést informace o fyziologických změnách související s procesem RD. V této práci byla provedena analýza močového proteomu vzorků odebraných před RD, jeden týden po RD a falešné RD a jeden měsíc po RD a falešné RD. Ve vzorku moči jeden týden po RD bylo identifikováno 16 unikátních proteinů (Tab. 3). 9 proteinů pocházelo pravděpodobně z ledvin, 5 proteinů doposud nebylo identifikováno v ledvinách potkana ani člověka. U dvou proteinů bylo prokázáno, že odpovídající mRNA není v určitých částech ledviny přítomna. Jsou to „fetuin-B“, extracelulární protein, jeho výskyt byl prokázán v plasmě i moči zdravých jedinců (Li *et al.*, 2014), a „regenerating islet-derived protein 3-gamma“. Přítomnost tohoto proteinu dosud nebyla v plasmě dokázána. Jeho funkcí je

regulace proliferace a diferenciacie keratinocytů po poškození, má také baktericidní účinky (UniprotKB). „Elongation factor 1-alpha 1“ je všudypřítomný protein, je stabilně syntetizován v normální tkáni, ale také za ischemických podmínek. Umožňuje následnou tvorbu proteinů, které adaptují buňky na stresové podmínky (Lange *et al.*, 2015). Přítomnost tohoto proteinu by mohla poukazovat na poškození buněk v důsledku zákroku RD stejně jako přítomnost intracelulárních proteinů. Rovněž dle zařazení proteinů do skupin podle termínů GO (Obr. 12) se 8 proteinů identifikovaných ve vzorku po RD účastní procesu hojení ran a 7 proteinů procesu regenerace. Jedním z těchto proteinů je „pyruvate kinase PKM“, svalový typ pyruvátkinasy. Zvýšená exprese *pkm* genu byla prokázána v rakovinných buňkách (Zhan *et al.*, 2015). Na poškození ledvin může poukazovat také přítomnost proteinu „trefoil factor 3“. Tento protein je možným markerem chronického poškození ledvin (Astor *et al.*, 2011). Zvýšený výskyt proteinů „Ig gamma-2B chain C region“ a „Ig gamma-1 chain C region“ byl v minulosti zaznamenán také v souvislosti s chronickým onemocněním ledvin (Vivekanandan-Giri *et al.*, 2011).

Ve vzorcích, které byly odebrány po jednom měsíci od zákroku RD byly v moči denervovaných jedinců identifikovány pouze 4 unikátní proteiny. Stejně jako ve vzorku odebraném jeden týden po RD byl i ve vzorku po jednom měsíci od zákroku identifikován „regenerating islet-derived protein 3-gamma“. Dříve byla prokázána zvýšená exprese genu odpovídajícího tomuto antibakteriálnímu peptidu v močovém měchýři a ledvinách při infekci bakterií *Escherichia coli* (Spencer *et al.*, 2015), přítomnost tohoto proteinu v moči tedy nemusí přímo souviset se zákrokem RD. „Period circadian protein homolog 3“ je důležitý pro regulaci cirkadiálních rytmů a nálady (Ritsner 2009). „Odorant-binding protein“ se běžně nachází v hleny čichového epitelu savců (Mitchell *et al.*, 2011), příčinou identifikace ve vzorku je pravděpodobně kontaminace moči hlenem zvířete. Ani jeden z těchto dvou proteinů dříve nebyl v moči identifikován. „Neutrophil gelatinase-associated lipocalin“ je protein, který se vyskytuje v ledvinách zdravých jedinců. Jeho produkce se masivně zvyšuje v buňkách tubulů po ledvinové ischemii, také byl dříve označen jako biomarker akutního poškození ledvin (Fouda *et al.*, 2013). Pro posouzení, zda přítomnost tohoto proteinu v moči zvířat přímo souvisí s RD nebo byl do moči vyplaven z ledvin přirozeně, by bylo třeba provést další experimenty, zejména kvantitativní stanovení proteinu ve vzorcích.

Informace o zdravotním stavu pokusných zvířat před a v průběhu experimentu nebyly k dispozici, avšak bylo zajímavé, že ve vzorcích moči před RD a jeden měsíc po

falešné RD byl identifikován angiotensinogen. Jeho zvýšená hladina v moči může být důsledkem zvýšené tvorby ANG II například při ANGII-dependentní hypertenzi (Yamamoto *et al.*, 2007; Kobori *et al.*, 2009). Dle obohacených GO termínů bylo 5 proteinů identifikovaných ve vzorku odebraném jeden měsíc po falešné RD přiřazeno do skupiny regulace průměru cévy (Obr. 13), tedy byly přítomny proteiny, které mají vliv na krevní tlak. Také přítomnost dalšího proteinu v moči před RD naznačuje, že zvířata trpěla hypertenzí. Protein „endothelin-converting enzyme 1“ je zařazen jako biomarker onemocnění hypertenze v Clinical Urine Proteomics Database. Jeho zvýšená tvorba v ledvinách byla také prokázána u potkanů s hypertenzí ve studii Disashi *et al.* (1997). Tento protein v žádném z ostatních vzorků analyzovaných v této práci nebyl identifikován.

Výrazný rozvoj v oblasti analýzy močového proteomu byl umožněn využitím metod MS (Olszowy a Buszewski, 2014). Protože koncentrace celkových proteinů v moči je nízká, užívá se různých kombinací metod pro zakoncentrování a separaci proteinů před samotnou MS analýzou (Adachi *et al.*, 2006). V této práci bylo s využitím acetonové precipitace proteinů z dialyzované či nedialyzované moči, následné SDS-PAGE separace proteinů a nanoLC separace peptidů identifikováno hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF/TOF nebo ESI-Q-TOF celkem 201 různých proteinů (po odstranění kontaminantů keratinů a trypsinu). Zerefos *et al.* (2006) využili k identifikaci proteinů z moči také zařízení MALDI-TOF/TOF, proteiny byly precipitovány 10% trichloroctovou kyselinou a separovány 2-DE. Tímto postupem dokázali identifikovat 44 proteinů. Smith *et al.* (2005) optimalizovali přípravu vzorku. Provedli dialýzu moči, lyofilizaci, extrakci na pevné fázi (C18) a 2-DE. Následnou analýzou hybridním TOF/TOF analyzátozem identifikovali 48 proteinů. Sanches-Juanes *et al.* (2013) analyzovali normální močový proteom potkanů třemi různými MS technikami: SDS-PAGE následovanou LC-ESI-MS/MS s analyzátozem iontovou pastí, 2-DE následovanou MALDI-TOF/TOF, spojením chromatofokusace a LC-ESI-Q-TOF analýzy. Zjistili, že z celkového počtu identifikovaných proteinů pouze 5,2 % bylo identifikováno všemi třemi technikami. To naznačuje, že použití různých technik pro identifikaci močových proteinů výrazně zvyšuje počet identifikací. Proteiny identifikované ve vzorcích, které byly v této práci analyzovány současně LC-MALDI-TOF/TOF a LC-ESI-Q-TOF, neodpovídají zjištění Sanches-Juanes *et al.* (2013). LC-MALDI-TOF/TOF metodou byl unikátně identifikován pouze jeden protein. Sanches-Juanes *et al.* (2013) využili pro odsolení proteinů gelovou permeační

chromatografii. Následnou 2DE a MALDI-TOF/TOF analýzou identifikovali 140 proteinů, zatímco 2-D LC-ESI-Q-TOF analýzou identifikovali 68 proteinů. LC-ESI-Q-TOF instrumentu bylo využito i ve studii Spahr *et al.* (2001), kdy proteiny získané z lyofilizované moči byly separovány 2-DE a následnou MS analýzou bylo identifikováno 124 proteinů. V této práci bylo v jednom vzorku moči identifikováno maximálně 71 proteinů s využitím LC-MALDI-TOF/TOF a 135 proteinů LC-ESI-Q-TOF.

Dle přiřazení identifikovaných proteinů k termínům GO se v moči před RD vyskytovaly peptidasy, proteasy, zymogeny a inhibitory enzymů. Z hlediska buněčné lokalizace se jednalo zejména o proteiny extracelulární, vesikulární či proteiny apikální strany membrány. To je v souladu s výsledky studie Adachi *et al.* (2006), ve které se zabývali charakterizací lidského močového proteomu. Přítomnost extracelulárních proteinů je předpokládána. Přítomnost vesikulárních proteinů a proteinů apikální strany membrány souvisí pravděpodobně s procesem tvorby exosomů (Adachi *et al.*, 2006). Exosomy jsou uvolňovány mnoha typy buněk a jsou zapojeny v procesech imunitní odpovědi, mezibuněčné komunikace a transportu (Marimuthu *et al.*, 2011).

6 ZÁVĚR

V rámci této práce byla vypracována literární rešerše zaměřená na problematiku močového systému, zejména stavbu a funkci ledvin a centrální mechanismy řízení funkce ledvin, a na výskyt proteinů v moči. Další část byla věnována přístupům k identifikaci proteinů v proteomice. Závěrečná část byla zaměřena na identifikaci proteinů v moči.

V praktické část byly provedeny experimenty pro výběr vhodného postupu pro zakoncentrování a separaci proteinů získaných z moči acetonovou precipitací. Ukázalo se, že dialýza moči před srážením proteinů zlepšuje rozlišení proteinů v gelu po separaci SDS-PAGE a následně zvyšuje počet identifikovaných proteinů metodou MALDI-TOF/TOF. Pro separaci proteinů byla vybrána metoda SDS-PAGE na základě vyššího počtu identifikovaných proteinů oproti nativní či denaturační IEF. Enzym pro štěpení proteinů v gelu byl rovněž zvolen podle vyššího počtu identifikovaných proteinů, proto byl trypsin upřednostněn před endoprotasou Glu-C.

Pro analýzy byly k dispozici vzorky moči před RD, jeden týden po RD či falešné RD a jeden měsíc po RD či falešné RD. Ve vzorku moči odebraném jeden týden a jeden měsíc po RD bylo identifikováno 16 proteinů respektive 4 proteiny, které nebyly prokázány ve vzorcích před RD ani po falešné RD. Mezi těmito proteiny byly i takové, označené v dříve publikovaných pracích jako markerové proteiny chronického poškození ledvin či ledvinové ischemie. Ve vzorcích před RD a jeden týden po falešné RD byly identifikovány proteiny, které jsou v literatuře uváděny ve spojitosti s onemocněním hypertenze.

V této práci bylo s využitím acetonové precipitace proteinů z dialyzované či nedialyzované moči, následné SDS-PAGE separace proteinů a nanoLC separace peptidů získaných po štěpení proteinů trypsinem v gelu identifikováno hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF/TOF nebo ESI-Q-TOF celkem 201 různých proteinů. Dle přiřazení identifikovaných proteinů k termínům GO se ve vzorcích moči vyskytovaly peptidasy, proteasy, zymogeny a inhibitory enzymů. Z hlediska buněčné lokalizace se jednalo zejména o proteiny extracelulární, vesikulární a proteiny apikální strany membrány.

7 LITERATURA

- Abdallah C., Dumas-Gaudot E., Renaut J., Sergeant K. (2012): Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance. *International Journal of Plant genomics* **2012**, 1-17.
- Adachi J., Kumar C., Zhang Y., Olsen J. V., Mann M. (2006): The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biology* **7**, R80.
- Astor B. C., Köttgen A., Hwang S. J., Bhavsar N., Fox C. S., Coresh J. (2011): Trefoil factor 3 predicts incident chronic kidney disease: a case-control study nested within the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *American Journal of Nephrology* **34**, 291-297.
- Barrett C. J. (2015): Renal sympathetic nerves - what have they got to do with cardiovascular disease? *Experimental Physiology* **100**, 359-365.
- Baggerman G., Vierstraete E., Loof A. D., Schoofs L. (2005): Gel-based versus gel-free proteomics: A review. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **8**, 669-677.
- Bernard A., Vivian C., Ouled A., Lauwerys R. (1987): Competition between low-and-high-molecular weight proteins for renal tubular uptake. *Nephron* **45**, 115-118.
- Berne R. M., Genuth S. M., Koeppen B. M., Kutchai H. C., Levy M. N., Murphy R. A., Stanton B. A., Staub N. C., Willis W. D. (1998): The kidney. In: *Physiology*, 4th ed., (Berne R. M., Levy M. N., Koeppen B. M., Stanton B. A. eds.), Mosby Inc., Missouri, U.S.A., 677-744.
- Booth R. E., Johnson J. P., Stockand J. D. (2002): Aldosterone. *Advances in Physiology Education* **26**, 8-20.
- Calhoun D. A., Jones D., Textor S., Goff D. C., Murphy T. P., Toto R. D., White A., Cushman W. C., White W., Sica D., Ferdinand K., Giles T. D., Falkner B., Carey R. M. (2008): Resistant hypertension: Diagnosis, Evaluation, and treatment. *Circulation* **117**, 510-526.
- Camerini S., Mauri P. (2015): The role of protein and peptide separation before mass spectrometry analysis in clinical proteomics. *Journal of Chromatography A* **1381**, 1-12.
- Campese V. M., Ku E, Park J. (2011): Sympathetic renal innervation and resistant hypertension. *International Journal of Hypertension* **2011**, <http://www.hindawi.com/journals/ijhy/2011/814354/>
- Carroll M. F., Temte J. L. (2000): Proteinuria in adults: a diagnostic approach. *American Family Physician* **62**, 1333-1340.
- Clayton S. C., Haack K. K. V., Zucker I. H. (2011): Renal denervation modulates angiotensin receptor expression in the renal cortex of rabbits with chronic heart failure. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* **300**, F32-F39.
- Clinical Urine Proteomics Database: <http://alexkentsis.net/urineproteomics/> (17.4.2016).
- Cordeiro A. P., Pereira R. A. S., Chapeaurouge A., Coimbra C. S., Perales J., Oliveira G., Candiani T. M. S., Coimbra R. S. (2015): Comparative proteomics of cerebrospinal fluid reveals a predictive model for differential diagnosis of pneumococcal, meningococcal, and enteroviral meningitis and novel putative therapeutic targets. *BMC Genomics* **16**, S11.
- Cottrell J. S. (2011): Protein identification using MS/MS data. *Journal of Proteomics* **74**, 1842-1851.
- Čihák R., Grim M. (2002): Systema urinarium - systém močový. In: *Anatomie 2*. 2nd ed., Grada Publishing, a.s., Praha, 247-257.
- DAVID Bioinformatics Resources 6.7: <https://david.ncifcrf.gov> (13.4.2016).
- Dibona G. F. (2003): Neural control of the kidney. Past, present, and future. *Hypertension* **41**, 621-624.
- Disashi T., Nonoguchi H., Iwaoka T., Naomi S., Nakayama Y., Shimada K., Tanzawa K., Tomita K. (1997): Endothelin converting enzyme-1 gene expression in the kidney of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **30**, 1591-1597.
- Dong Y., Zhao Q., Ma X., Ma G., Liu C., Chen Z., Yu L., Liu X., Zhang Y., Shao S., Xiao J., Li J., Zhang W., Fu M., Dong L., Yang X., Guo X., Xue L., Fang F., Zhan Q., Zhang L. (2015): Establishment of a new OSCC cell line derived from OLK and identification of

- malignant transformation-related proteins by differential proteomics approach. *Scientific Reports* **5**, 12668, 1-11.
- Dooley R., Harvey B. J., Thomas W. (2012): Non-genomic actions of aldosterone: From receptors and signals to membrane targets. *Molecular and Cellular Endocrinology* **350**, 223-234.
- Engel L., Saveliev S., Urh M., Simpson D., Jones R., Wood K (2006): Using endoproteinases Asp-N and Glu-C to improve protein characterization. <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/using-endoproteinases-asp-n-and-glu-c-to-improve-protein-characterization/> (13.4.2016).
- Firkin F. (2009): Screening for multiple myeloma. *Australian Prescriber* **32**, 92-94.
- Fouda M., Sherif H. M., Shehata M., Ibrahim A. (2013): Early expression of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin biomarker predicts acute kidney injury complicating circulatory shock. *The Egyptian Journal of Critical Care Medicine* **1**, 79-86.
- Gao Y. (2013): Urine – an untapped goldmine for biomarker discovery? *Science China Life Sciences* **56**, 1145-1146.
- Gregorich Z. R., Chang Y. C., Ge Y. (2014): Proteomics in heart failure: top-down or bottom-up? *European Journal of Physiology* **466**, 1199-1209.
- Guo H., Li X., Frey D. D. (2014): Development of chromatofocusing techniques employing mixed-mode column packings for protein separations. *Journal of Chromatography A* **1323**, 57-65.
- Harrison-Bernard L. M. (2009): The renal renin-angiotensin system. *Advances in Physiology Education* **33**, 270-274.
- Henzel W. J., Watanabe C., Stults J. T. (2003): Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **14**, 931-942.
- Hill R. W., Wyse G. A., Anderson M. (2008): Urine formation in mammals. In: *Animal Physiology*. 2nd ed., Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, U.S.A., 724-738.
- Huan Y., Cohen D. L. (2013): Renal denervation: a potential new treatment for severe hypertension. *Clinical Cardiology* **36**, 10-14.
- Huang D. W., Sherman B. T., Lempicki R. A. (2009): Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protocols* **4**, 44-57.
- Chang Y. H., Ye L., Cai W., Lee Y., Guner H., Lee Y., Kamp T. J., Zhang J., Ge Y. (2015): Quantitative proteomics reveals differential regulation of protein expression in recipient myocardium after trilineage cardiovascular cell transplantation. *Proteomics* **15**, 2560-2567.
- Chevalier F. (2010): Highlights on the capacities of “gel based” proteomics. *Proteome Science* **8**:23. <http://www.proteomesci.com/content/8/1/23>
- Chiu C. W., Chen H. M., Wu T. T., Shin Y. C., Huang K. K., Tsai Y. F., Hsu Y. L., Chen S. F. (2015): differential proteomics of monosodium urate crystals-induced inflammatory response in dissected murine air pouch membranes by iTRAQ technology. *Proteomics* **15**, 3338-3348.
- Christensen E. I., Verroust P. J., Nielsen R. (2009): Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *European Journal of Physiology* **458**, 1039-1048.
- Iqbal J., Li W., Hasan M., Liu K., Awan U., Saeed Y., Zhang Y., Khan A. M., Shah A., Qing H., Deng Y. (2014): Differential expression of specific cellular defense proteins in rat hypothalamus under simulated microgravity induced conditions: comparative proteomics. *Proteomics* **14**, 1424-1433.
- Issaq H. J., Veenstra T. D., Conrads T. P., Felschow D. (2002): The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **292**, 587-592.
- Jafari M., Primo V., Smejkal G. B., Moskovets E. V., Kuo W. P., Ivanov A. R. (2012): Comparison of in-gel protein separation techniques commonly used for fractionation in mass spectrometry-based proteomic profiling. *Electrophoresis* **33**, 2516-2526.
- Jenkins M. A. (2009): Serum and urine electrophoresis for detection and identification of monoclonal proteins. *The Clinical Biochemist Reviews* **30**, 119-122.
- Jones E. A. (2005): *Xenopus*: A prince among models for pronephric kidney development. *Journal of the American Society of Nephrology* **16**, 313-321.

- Kalantari S., Jafari A., Moradpoor R., Ghasemi E., Khalkhal E. (2015): Human urine proteomics: analytical techniques and clinical application in renal diseases. *International Journal of Proteomics* **2015**, 1-17, <http://www.hindawi.com/journals/ijpro/2015/782798/>.
- Katholi R. E., Rocha-Singh K. J. (2009): The role of renal sympathetic nerves in hypertension: has percutaneous renal denervation refocused attention on their clinical significance? *Progress in Cardiovascular Disease* **52**, 243-248.
- Kelleher N. L., Thomas P. M., Ntai I., Compton P. D., LeDuc R. D. (2014): deep and quantitative top-down proteomics in clinical and translational research. *Proteomics* **11**, 649-651.
- Kentsis A., Monigatti F., Dorff K., Campagne F., Bachur R., Steen H. (2009): Urine proteomics for profiling of human disease using high accuracy mass spectrometry. *Proteomics Clinical Applications* **3**, 1052-1061.
- Kidney and urinary pathway knowledge base: <http://www.kupkb.org> (13.4.2016).
- Kittnar O., Mlček M. (2009): Řízení funkcí ledvin. In: *Atlas fyziologických regulací*. 1st ed. (Vokrouhlický L., Mareš J. eds.), Grada Publishing, a.s., Praha, 186-212.
- Kittnar O., Jandová K., Kurišćák E., Langmeier M., Marešová D., Mlček M., Mysliveček J., Pokorný J., Rijak V., Trojan S. (2011): Fyziologie vylučování. In: *Lékařská fyziologie*. 1st ed. (Vokrouhlický L., Vízek M. eds.), Grada Publishing, a.s., Praha, 385-417.
- Klodmann J., Lewejohann D., Braun H. P. (2011): Low-SDS blue native PAGE. *Proteomics* **11**, 1834-1839.
- Kobori H., Alper A. B., Shenava R., Katsurada A., Saito T., Ohashi N., Urushihara M., Miyata K., Satou R., Hamm L. L., Navar L. G. (2009): Urinary angiotensinogen as a novel biomarker of the intrarenal renin-angiotensin system status in hypertensive patients. *Hypertension* **53**, 344-350.
- Lange N., Unger F. T., Schöppler M., Pursche K., Juhl H., David K. A. (2015): Identification and validation of a potential marker of tissue quality using gene expression analysis of human colorectal tissue. *PLOS ONE*, <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0133987>.
- Langmeier M., Kittnar O., Marešová D., Pokorný J. (2009): Základní procesy tvorby moči In: *Základy lékařské fyziologie*. 1st ed. (Sobotka P., Vízek M. eds.), Grada Publishing, a.s., Praha, 111-123.
- Lee W. C., Lee K. H. (2004): Applications of affinity chromatography in proteomics. *Analytical Biochemistry* **324**, 1-10.
- Li M., Zhao M., Gao Y. (2014): Changes of proteins induced by anticoagulants can be more sensitively detected in urine than in plasma. *Science Chine Life Sciences* **57**, 649-665.
- Liebler D. C. (2002): Overview of analytical proteomics. In: *Introduction to proteomics: tools for the new biology*. (Hoather-Potter K. ed.) Humana Press Inc., New Jersey, U.S.A., 27-30.
- Lovrić J. (2011): Introduction; Separation and detection technologies; Analysis of peptides/proteins by mass spectrometry. In: *Introducing proteomics: from concepts to sample separation, mass spectrometry, and data analysis*. 1st ed., John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, UK.
- Maack T. (1996): Role of atrial natriuretic factor in volume control. *Kidney International* **49**, 1732-1737.
- Mann M., Wilm M. (1994): Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Analytical Chemistry* **66**, 4390-4399
- Marimuthu A., O'Meally R. N., Chaerkady 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., Pandey A. (2011): A comprehensive map of the human urinary proteome. *Journal of Proteome Research* **10**, 2734-2743.
- Matrixscience.com: http://www.matrixscience.com/search_intro.html (23. 2. 2016).
- McDonnell L. A., Heeren R. M. A (2007): Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **26**, 606-643.
- McHugh L., Arthur J. W. (2008): Computational methods for protein identification from mass spectrometry data. *Computational Biology* **4**, e12.

- McCorry L. K. (2007): Physiology of the autonomic nervous system. *American Journal of Pharmaceutical Education* **71**, Article 78, 1-11.
- Mitchell G. B., Clark M. E., Caswell J. L. (2011): Localization and functional characterization of pulmonary bovine odorant-binding protein. *Veterinary Pathology* **48**, 1054-1060.
- Molina L., Salvetat N., Ameer R. B., Peres S., Sommerer N., Jarraya F., Ayadi H., Molina F., Granier C. (2011): Analysis of the variability of human normal urine by 2D-GE reveals a “public” and a “private” proteome. *Journal of proteomics* **75**, 70-80.
- Monteoliva L., Albar J. P. (2004): Differential proteomics: An overview of gel and non-gel based approaches. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* **3**, 220-239.
- Morissette M. P. (1977): Colloid osmotic pressure: its measurement and clinical value. *Canadian Medical Association Journal* **116**, 897-900.
- Naderi A. S. A., Reilly R. F. (2008): Primary care approach to proteinuria. *Journal of the American Board of Family Medicine* **21**, 569-574.
- Novák F. (2002): Analýza proteinů v moči. In: *Úvod do klinické biochemie*. 1st ed. (Entlicher G., Schneiderka P., Votruba M. eds.), Nakladatelství Karolinum, Praha, 134-137.
- Olsen J. V., Ong S., Mann M. (2004): Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular & Cellular Proteomics*, **3**, 608-614.
- Olszowy P., Buszewski B. (2014): Urine sample preparation for proteomic analysis. *Journal of Separation Science*, **37**, 2920-2928.
- Park J., Yun H. S., Lee K. H., Lee K. T., Lee J. K., Lee S. Y. (2015): Discovery and validation of biomarkers that distinguish mucinous and nonmucinous pancreatic cysts. *Cancer Research* **75**, 3227-3235.
- Parkash J., Kashyap S., Kalita P. J., Devi M., Ahuja P. S., Dutt S. (2014): Differential proteomics of *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth. In response to dark stress. *Molecular biology Reports* **41**, 6051-6062.
- Pieper R., Gatlin C. L., McGrath A. M., Makusky A. J., Mondal M., Seonarain M., Field E., Schatz C. R., Estock 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.
- Plasma proteome database: <http://www.plasmaproteomedatabase.org> (14.4.2016).
- Prochnau D., Figulla H. R., Surbert R. (2013): Renal denervation in the treatment of drug-resistant hypertension: current knowledge and future perspectives. *Expert Review of Medical Devices* **10**, 247-256.
- Racek J., Eiselt J., Friedecký B., Holeček V., Nekulová M., Pittrová H., Rušavý Z., Senft V., Šavlová M., Těšínský P., Verner M (1999): Bílkovina v moči. In: *Klinická biochemie*. 1st ed. (Dastych M., Matouš B., Verner M. eds.), Galén, Praha, 54-55.
- Raila J., Forterre S., Schweigert F. J. (2005): Physiologic and pathophysiologic fundamentals of proteinuria – a review. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift Journal* **118**, 229-239.
- Ritsner M. S. (2009): Circadian rhythms- related genes. In: *The handbook of neuropsychiatric biomarkers, endophenotypes and genes: Volume IV. Molecular genetic and genomic markers*. Springer Science & Business Media. 131.
- Robertson E. F., Dannelly H. K., Malloy P. J., Reeves H. C. (1987): Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Analytical Biochemistry* **167**, 290-294.
- Rodríguez-Suárez E., Siwy J., Zürbig P., Mischak H. (2014): Urine as a source for clinical proteome analysis: From discovery to clinical application. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1844**, 884-898.
- Sainio K., Raatikainen-Ahokas A. (1999): Mesonephric kidney - a stem cell factory? *The International Journal of Developmental Biology* **43**, 435-439.
- Sánchez-Juanes F., Muniz M. C., Raboso C., Rodríguez-Prieto S., Paradela A., Quiros Y., López-Hernández F., González-Buitrago J. M., Ferreira L. (2013): Unveiling the rat urinary proteome with three complementary proteomics approaches. *Electrophoresis* **34**, 2473-2483.
- Schägger H., von Jagow G. (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* **199**, 223-231.

- Sharma S., Rajmani R. S., Kumar A., Bhaskar A., Singh A., Manivel V., Tyagi A. K., Rao K. V. S. (2015): Differential proteomics approach to identify putative protective antigens of *Mycobacterium tuberculosis* presented during early stages of macrophage infection and their evaluation as DNA vaccines. *Indian Journal of Experimental Biology* **53**, 429-439.
- Sharman A., Low J. (2008): Vasopressin and its role in critical care. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* **8**, 134-137.
- Sigmaaldrich.com:
<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/p6181bul.pdf>
 (26.4.2016)
- Silverthorn D. U., Johnson B. R., Ober W. C., Garrison C. W., Silverthorn A. C. (2010): The kidneys. In: *Human Physiology*. 5th ed. (Espinoza D., German K., Yien B., Reid A., Cutt S., Earl W. eds.), Pearson Education, Inc., San Francisco, U.S.A., 623-644.
- Smith G., Barratt D., Rowlinson R., Nickson R., Nickson J., Tonge R. (2005): Development of a high-throughput method for preparing human urine for two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **5**, 2315-2318.
- Spahr C. S., Davis M. T., McGinley M. D., Robinson J. H., Bures E. J., Beierle J., Mort J., Courchesne P. L., Chen K., Wahl R. C., Yu W., Luethy R., Patterson S. D. (2001): Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry I. Profiling an unfractionated tryptic digest. *Proteomics* **1**, 93-107.
- Sparks M. A., Crowley S. D., Gurley S. B., Mirotsoy M., Coffman T. M. (2014): Classical renin-angiotensin system in kidney physiology. *Comprehensive Physiology* **4**, 1201-1228.
- Spencer J. D., Jackson A. R., Li B., Ching C. B., Vonau M., Easterling R. S., Schwaderer A. L., McHugh K. M., Becknell B. (2015): Expression and significance of the HIP/PAP and RegIII γ antimicrobial peptides during mammalian urinary tract infection. *PLOS ONE*, <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0144024>.
- Swaney D. L., Wenger C. D., Coon J. J. (2010): The value of using multiple proteases for large-scale mass spectrometry-based proteomics. *Journal of proteome research* **5**, 1323-1329.
- Šebela M., Štosová T., Havliš J., Wielsch N., Thomas H., Zdráhal Z., Schevchenko A. (2006): Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics* **6**, 2959-2963.
- Taylor A. E. (1981): Capillary fluid filtration. Starling forces and lymph flow. *Circulation Research* **49**, 557-575.
- Tesař V., Schück O., Bartoníčková K., Čertíková-Chábová V., Červenka L., Engliš M., Honsová E., Horáčková M., Jančová E., Lácha J., Lukáč M., Merta M., Opatrná S., Opatrný K., Reiterová J., Ryšavá R., Teplan V., Viklický O., Vítko Š. (2006): Fyziologie ledvin; Vyšetrovací metody In: *Klinická nefrologie*. 1st ed. (Monhart V., Fixa P. eds.), Grada Publishing, a.s., Praha, 25-104.
- Tessitore A., Gaggiano A., Ciciarelli G., Verzella D., Fischietti M., Zazzeroni F., Alesse E. (2013): Serum biomarkers identification by mass spectrometry in high-mortality tumors. *International Journal of Proteomics* **2013**, <http://www.hindawi.com/journals/ijpro/2013/125858/>
- ThermoFisher.com: <https://www.thermoFisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/protein-gel-stains.html> (18. 2. 2016).
- Thongboonkerd V., McLeish K. R., Arthur J. M., Klein J. B. (2002): Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney International* **62**, 1461-1469.
- Thongboonkerd V., Klein E., Klein J. B. (2004): Sample preparation for 2-D proteomic analysis. *Contributions to nephrology* **141**, 11-24.
- Thongboonkerd V., Chutipongtanate S., Kanlaya R. (2006): Systematic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics: quantity, quality, and variability. *Journal of Proteome Research* **5**, 183-191.
- Thongboonkerd V. (2007): Practical points in urinary proteomics. *Journal of proteome research* **6**, 3881-3890.

- Tran J. C., Zamdborg L., Ahlf D. R., Catherman A. D., Durbin K. R., Tipton J. D., Vellaichamy A., Kellie J. F., Li M., Wu C., Sweet S. M., Early B. P., Siuti N., LeDuc R. D., Compton P. D., Thomas P. M., Kelleher N. L. (2011): Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics. *Nature* **480**, 254-258.
- UniProtKB: <http://www.uniprot.org> (13.4.2016).
- Veenstra T. D., Yates J. R. (2006): Diagnostic proteomics In: *Proteomics for biological discovery*. 1st ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, U.S.A., 247-276.
- Vivekanandan-Giri A., Slocum J. L., Buller C., Basrur V., Ju W., Pop-Busui R., Lubman D. M., Kretzler M., Pennathur S. (2011): Urine glycoprotein profile reveals novel markers for chronic kidney disease International *Journal of Proteomics* 2011, <http://www.hindawi.com/journals/ijpro/2011/214715/>.
- Wang F., Chmil C., Pierce F., Ganapathy K., Gump B. B., MacKenzie J. A., Mechref Y., Bendinskas K. (2013): immobilized metal affinity chromatography and human serum proteomics. *Journal of Chromatography B* **934**, 26-33.
- Wang P., Wilson S. R. (2013): Mass spectrometry-based protein identification by integrating de novo sequencing with database searching. *BMC Bioinformatics* **14**, S24, <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/14/S2/S24>.
- Wehr T. (2006): Top-down versus bottom-up approaches in proteomics. *LCGC North America* **24**, <http://www.chromatographyonline.com/top-down-versus-bottom-approaches-proteomics-0>
- Westermeyer R., Naven T., Höpker H. R. (2008): Introduction In: *Proteomics in practice*. 2nd ed., Wiley-VCH Verlag-GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Nemecko, 1-16.
- Wittig I., Braun H. P., Schägger H. (2006): Blue native PAGE. *Nature Protocols* **1**, 418-428.
- Wolfson.huji.ac.il.
<http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/ReversePhase/AmershamRPCManual.pdf>.
 (3. 4. 2016)
- Wu C., Tran J. C., Zamdborg L., Durbin K. R., Li M., Ahlf D. R., Early B. P., Thomas P. M., Sweedler J. V., Kelleher N. L. (2012): A protease for middle down proteomics. *Nature Methods* **9**, 822-824.
- Wu J., Chen Y., Gu W. (2010): Urinary proteomics as a novel tool for biomarker discovery in kidney diseases. *Journal of Zhejiang University Science B (Biomedicine & Biotechnology)* **11**, 227-237).
- Xiu L., Valeja S. G., Alpert A. J., Jin S., Ying G. (2014): Effective protein separation by coupling hydrophobic interaction and reverse phase chromatography for top-down proteomics. *Analytical Chemistry* **86**, 7899-7906.
- Yamamoto T., Nakagawa T., Suzuki H., Ohashi N., Fukasawa H., Fujigaki Y., Kato A., Nakamura Y., Suzuki F., Hishida A. (2007): Urinary Angiotensinogen as a marker of intrarenal angiotensin II activity associated with deterioration of renal function in patients with chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **18**, 1558-1565.
- Yang G., Xu Z., Lu W., Li X., Sun C., Guo J., Xue P., Guan F. (2015): Quantitative analysis of differential proteome expression in bladder cancer vs. normal bladder cells using SILAC method. *Public Library of Science One* **10**, <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0134727>.
- Zerefos P. G., Vougas K., Dimitraki P., Kossida S., Petrolekas A., Stravodimos K., Giannopoulos A., Fountoulakis M., Vlahou A. (2006): Characterization of the human urine proteome by preparative electrophoresis in combination with 2-DE. *Proteomics* **6**, 4346-4355.
- Zhan C., Yan L., Wang L., Ma J., Jiang W., Zhang Y., Shi Y., Wang Q. (2015): Isoform switch of pyruvate kinase M1 indeed occurs but not to pyruvate kinase M2 in human tumorigenesis. *PLOS ONE* 2015, <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0118663>.
- Zhang Y., Fonslow B. R., Shan B., Baek M. C., Yates J. R. (2013): Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical Reviews* **113**, 2343-2394.
- Zhao M., Li X., Li M., Gao Y (2015): Effects of anesthetics pentobarbital sodium and chloral hydrate on urine proteome. *PeerJ* **3**, e813, 1-14, <https://peerj.com/articles/813/>.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2-D	dvourozměrný
2-D DIGE	dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza
2-DE	dvourozměrná gelová elektroforéza
Å	angstroem
AC	afinitní chromatografie
ACN	acetonitril
ADH	antidiuretický hormon
AmBic	hydrogenuhličitan amonný
ANG I	angiotensin I
ANG II	angiotensin II
ANP	atriální natriuretický peptid
BN-PAGE	nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti barviva Coomassie brilantové modři G-250
CE	kapilární elektroforéza
CHCA	kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová
kDa	kilodalton
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EBI	Evropský bioinformatický intitut
ECT	extracelulární tekutina
ELISA	„enzyme-linked immuno-sorbent assay“
ESI	ionizace elektrosprejem
EST	„expressed sequence tag“
GB	„gel-based“ využívající gelu
GEF	„gel-free“ nevyužívající gelu
GF	glomerulární filtrace
GO	genová ontologie
IEC	iontově výměnná chromatografie
IEF	isoelektrická fokusace
Ig	imunoglobulin
MALDI	ionizace za účasti matrice
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie

MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MudPIT	technologie multidimenzionální proteinové identifikace
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti a náboje
NCBI	Národní centrum pro biotechnologickou informaci
P_{GC}	hydrostatický tlak v glomerulárních kapilárách
PKM	svalová pyruvátkinasa
PMF	metoda peptidového mapování
PTM	posttranslační modifikace
Q-TOF	hybridní hmotnostní spektrometr a kvadrupólem a analyzátozem doby letu
RAS	renin-angiotensinový systém
RD	renální denervace
RPLC	kapalinová chromatografie na reverzní fázi
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného
SEC	vylučovací chromatografie
SELDI	ionizace využívající desorpci analytu z obohaceného povrchu
SDS	dodecylsírany sodný
SNS	sympatický nervový systém
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin
TFA	kyselina trifluoroctová
TGF	tubuloglomerulární zpětná vazba
TOF	analyzátozem doby letu
U-prot/U-Cr	poměr množství proteinu a kreatininu v moči
v/v	objem na objem
w/v	hmotnost na objem

9 PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1 - Tabulka zobrazující proteiny identifikované v experimentu pro výběr vhodné metody pro separaci proteinů.

Tab. 5 Proteiny identifikované ve vzorku moči při využití různých metod pro separaci proteinů.

Identifikační zkratka	Název proteinu	Metoda		
		SDS-PAGE	IEF nat.	IEF denat.
A1AG_RAT	Alpha-1-acid glycoprotein	+	-	-
A1AT_RAT	Alpha-1-antitrypsin	+	-	+
AMPN_RAT	Aminopeptidase N	+	-	-
CADH1_RAT	Cadherin-1	+	+	+
CYTC_RAT	Cystatin-C	+	+	-
22P1_RAT	Cystatin-related protein 1	+	+	+
DNAS1_RAT	Deoxyribonuclease-1	+	+	+
LEG5_RAT	Galectin-5	+	-	+
KLK7_RAT	Glandular kallikrein-7, submandibular/renal	+	-	+
HEMO_RAT	Hemopexin	+	-	-
KACB_RAT	Ig kappa chain C region, B allele	+	+	+
LAC2_RAT	Ig lambda-2 chain C region	+	-	-
KLK1_RAT	Kallikrein-1	+	-	-
LRP2_RAT	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	+	-	+
MUP_RAT	Major urinary protein	+	+	+
MUP_RATRT	Major urinary protein (Fragments)	+	-	+
MXRA8_RAT	Matrix-remodeling-associated protein 8	+	-	+
MEP1A_RAT	Meprin A subunit alpha	+	-	-

Tab. 5 Proteiny identifikované ve vzorku moči při využití různých metod pro separaci proteinů (*pokračování*).

Identifikační zkratka	Název proteinu	Metoda		
		SDS-PAGE	IEF nat.	IEF denat.
NF1_RAT	Neurofibromin	-	+	-
AMYP_RAT	Pancreatic alpha-amylase	+	+	+
PBAS_RAT	Probasin	-	-	+
EGF_RAT	Pro-epidermal growth factor	+	-	+
PSC1_RAT	Prostatic steroid-binding protein C1	+	-	-
PSC2_RAT	Prostatic steroid-binding protein C2	+	-	-
AMBP_RAT	Protein AMBP	+	-	-
REG3G_RAT	Regenerating islet-derived protein 3-gamma	+	-	+
SPA3K_RAT	Serine protease inhibitor A3K	+	+	+
SPA3L_RAT	Serine protease inhibitor A3L	+	-	-
TRFE_RAT	Serotransferrin	+	-	+
ALBU_RAT	Serum albumin	+	+	+
UP1_RAT	Urinary protein 1	+	+	-
UP2_RAT	Urinary protein 2	+	-	-
UROM_RAT	Uromodulin	+	-	-

(+) přítomen, (-) nepřítomen

9.2 Příloha 2 – Tabulka zobrazující proteiny identifikované v experimentu pro výběr vhodné proteasy pro štěpení proteinů

Tab. 6 Proteiny identifikované ve vzorku moči před RD a jeden týden po RD při využití různých proteolytických enzymů.

Identifikační zkratka	Název proteinu	Trypsin		Glu-C	
		Před RD	Po RD	Před RD	Po RD
ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1	+	-	-	-
AFAM_RAT	Afamin	-	+	-	-
A1AG_RAT	Alpha-1-acid glycoprotein	+	+	-	-
A1AT_RAT	Alpha-1-antiproteinase	+	-	+	+
A1M_RAT	Alpha-1-macroglobulin	+	-	-	-
FETUA_RAT	Alpha-2-HS-glycoprotein	+	-	+	-
AMPN_RAT	Aminopeptidase N	+	+	+	-
ANTR1_RAT	Anthrax toxin receptor 1	+	+	-	-
APOE_RAT	Apolipoprotein E	-	+	-	-
BGLR_RAT	Beta-glucuronidase	+	-	-	-
BTD_RAT	Biotinidase	+	-	-	-
CADH1_RAT	Cadherin-1	+	+	+	+
EST1C_RAT	Carboxylesterase 1C	+	-	-	-
CBPQ_RAT	Carboxypeptidase Q	+	-	-	-
CATB_RAT	Cathepsin B	+	+	-	-
CD59_RAT	CD59 glycoprotein	-	+	-	-
HA11_RAT	Class I histocompatibility antigen, Non-RT1.A alpha-1	+	-	-	-
CYTC_RAT	Cystatin-C	+	+	-	-
22P1_RAT	Cystatin-related protein 1	+	+	-	-
DNAS1_RAT	Deoxyribonuclease-1	+	+	+	-

Tab. 6 Proteiny identifikované ve vzorku moči před RD a jeden týden po RD při využití různých proteolytických enzymů (*pokračování*).

Identifikační zkratka	Název proteinu	Trypsin		Glu-C	
		Před RD	Po RD	Před RD	Po RD
DPP4_RAT	Dipeptidyl peptidase 4	+	+	-	-
FINC_RAT	Fibronectin	+	-	-	-
GGH_RAT	Gamma-glutamyl hydrolase	+	-	-	-
GGT1_RAT	Gamma-glutamyltranspeptidase 1	+	+	-	-
GELS_RAT	Gelsolin	+	-	-	-
KLK7_RAT	Glandular kallikrein-7, submandibular/renal	+	+	-	-
AMPE_RAT	Glutamyl aminopeptidase	-	+	-	-
HSP72_RAT	Heat shock-related 70 kDa protein 2	+	-	-	-
HEMO_RAT	Hemopexin	+	+	-	-
KACB_RAT	Ig kappa chain C region, B allele	+	+	+	+
LAC2_RAT	Ig lambda-2 chain C	+	-	-	-
IL4RA_RAT	Interleukin-4 receptor subunit alpha	+	-	-	-
KLK1_RAT	Kallikrein-1	+	+	-	-
LRP2_RAT	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	+	+	-	-
MUP_RATRT	Major urinary protein (Fragments)	+	+	-	-
MUP_RAT	Major urinary protein	+	+	+	+
MXRA8_RAT	Matrix-remodeling-associated protein 8	+	-	-	-
MEP1A_RAT	Meprin A subunit alpha	+	+	-	-
MEP1B_RAT	Meprin A subunit beta	+	+	-	-
NPTN_RAT	Neuroplastin	+	-	-	-
AMYP_RAT	Pancreatic alpha-amylase	+	+	-	-
EGF_RAT	Pro-epidermal growth factor	+	+	+	+
PIP_RAT	Prolactin-inducible protein homolog	+	-	-	-

Tab. 6 Proteiny identifikované ve vzorku moči před RD a jeden týden po RD při využití různých proteolytických enzymů (*pokračování*).

Identifikační zkratka	Název proteinu	Trypsin		Glu-C	
		Před RD	Po RD	Před RD	Po RD
PTGDS_RAT	Prostaglandin-H2 D-isomerase	+	-	-	-
SPBP_RAT	Prostatic spermine-binding protein	-	+	-	-
PSC2_RAT	Prostatic steroid-binding protein C2	-	+	-	-
AMBP_RAT	Protein AMBP	+	+	-	-
SPA3L_RAT	Serine protease inhibitor A3L	+	+	+	+
TRFE_RAT	Serotransferrin	+	+	-	-
ALBU_RAT	Serum albumin	+	+	-	+
KLK9_RAT	Submandibular glandular kallikrein-9	-	+	-	-
SODC_RAT	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	+	+	-	-
SDC4_RAT	Syndecan-4	+	-	-	-
KNT1_RAT	T-kininogen 1	-	-	-	+
UP1_RAT	Urinary protein 1	+	+	-	-
UP2_RAT	Urinary protein 2	+	+	+	+
UP3_RAT	Urinary protein 3	+	-	-	-
UROM_RAT	Uromodulin	+	+	-	-

(+) přítomen, (-) nepřítomen

9.3 Příloha 3 – Tabulka zobrazující proteiny identifikované ve vzorcích moči prvního odběru

Tab. 7 Proteiny identifikované ve vzorku moči před RD, jeden týden po RD a jeden týden po falešné RD.

Identifikační zkratka	Název proteinu	ESI-Q-TOF			MALDI-TOF/TOF		
		Před RD	Po RD	Po falešné RD	Před RD	Po RD	Po falešné RD
CH60_RAT	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	+	-	-	-	-	-
6PGL_RAT	6-phosphogluconolactonase	+	-	-	-	-	-
AN32A_RAT	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	+	+	+	-	-	-
ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1	+	+	-	-	-	-
AFAM_RAT	Afamin	+	-	-	-	-	-
AL3B1_RAT	Aldehyde dehydrogenase family 3 member B1	+	-	+	-	-	-
A1AG_RAT	Alpha-1-acid glycoprotein	+	+	+	-	-	-
A1AT_RAT	Alpha-1-antitrypsin	+	+	+	-	+	-
ADA1B_RAT	Alpha-1B adrenergic receptor	-	-	+	-	-	-
A1I3_RAT	Alpha-1-inhibitor 3	+	+	-	-	+	-
A1M_RAT	Alpha-1-macroglobulin	+	-	-	-	-	-
FETUA_RAT	Alpha-2-HS-glycoprotein	+	+	+	-	-	-
AMPN_RAT	Aminopeptidase N	+	-	-	-	-	-
ANGT_RAT	Angiotensinogen	+	-	-	-	-	-
ANXA2_RAT	Annexin A2	-	-	+	-	-	-
AP1M1_RAT	AP-1 complex subunit mu-1	+	-	+	-	-	-
APOB_RAT	Apolipoprotein B-100	+	+	+	-	-	-
APOE_RAT	Apolipoprotein E	-	+	+	-	-	-
ATLA1_RAT	Atlastin-1	+	-	-	-	-	-
ATRN_RAT	Attractin	+	-	-	-	-	-

Tab. 7 Proteiny identifikované ve vzorku moči před RD, jeden týden po RD a jeden týden po falešné RD (*pokračování*).

Identifikační zkratka	Název proteinu	ESI-Q-TOF			MALDI-TOF/TOF		
		Před RD	Po RD	Po falešné RD	Před RD	Po RD	Po falešné RD
BARH1_RAT	BarH-like 1 homeobox protein	+	+	+	-	-	-
DEFB1_RAT	Beta-defensin 1	-	-	+	-	-	-
BGLR_RAT	Beta-glucuronidase	+	+	+	-	-	-
BIN3_RAT	Bridging integrator 3	+	+	+	-	-	-
CADH1_RAT	Cadherin-1	+	+	+	-	+	-
CALB1_RAT	Calbindin	+	-	+	-	-	-
CAN1_RAT	Calpain-1 catalytic subunit	-	-	+	-	-	-
EST1C_RAT	Carboxylesterase 1C	+	-	+	-	-	-
CBPQ_RAT	Carboxypeptidase Q	+	+	-	-	-	-
CATB_RAT	Cathepsin B	+	-	-	-	-	-
CD44_RAT	CD44 antigen	+	+	-	-	-	-
CD48_RAT	CD48 antigen	+	-	-	-	-	-
CD59_RAT	CD59 glycoprotein	+	+	+	-	-	-
CK5P1_RAT	CDK5 regulatory subunit-associated protein 1	-	+	-	-	-	-
CEGT_RAT	Ceramide glucosyltransferase	+	+	+	-	-	-
CLAP2_RAT	CLIP-associating protein 2	+	-	-	-	-	-
CO1A1_RAT	Collagen alpha-1(I) chain	+	-	-	-	-	-
CO4_RAT	Complement C4	-	+	+	-	-	-
CFAD_RAT	Complement factor D	+	-	-	-	-	-
SPR1A_RAT	Cornifin-A	-	+	-	-	-	-
CBG_RAT	Corticosteroid-binding globulin	+	-	-	-	-	-
CR3L2_RAT	Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 2	-	-	+	-	-	-

Tab. 7 Proteiny identifikované ve vzorku moči před RD, jeden týden po RD a jeden týden po falešné RD (pokračování).

Identifikační zkratka	Název proteinu	ESI-Q-TOF			MALDI-TOF/TOF		
		Před RD	Po RD	Po falešné RD	Před RD	Po RD	Po falešné RD
CDKL2_RAT	Cyclin-dependent kinase-like 2	+	-	-	-	-	-
CYTA_RAT	Cystatin-A	-	+	+	-	-	-
CYTC_RAT	Cystatin-C	+	-	+	-	-	-
22P1_RAT	Cystatin-related protein 1	+	+	+	+	-	+
22P2_RAT	Cystatin-related protein 2	+	-	+	-	-	-
CP2C7_RAT	Cytochrome P450 2C7	-	-	+	-	-	-
DYHC1_RAT	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	+	+	-	-	-	-
DNAS1_RAT	Deoxyribonuclease-1	+	+	+	+	+	-
DPP2_RAT	Dipeptidyl peptidase 2	+	+	-	-	-	-
DPP4_RAT	Dipeptidyl peptidase 4	+	-	-	-	-	-
DPOLB_RAT	DNA polymerase beta	-	-	+	-	-	-
TOP2A_RAT	DNA topoisomerase 2-alpha	-	-	+	-	-	-
OST48_RAT	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	+	-	-	-	-	-
DBNL_RAT	Drebrin-like protein	+	+	+	-	-	-
DCTN1_RAT	Dynactin subunit 1	-	-	+	-	-	-
TRIPC_RAT	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	+	-	-	-	-	-
EF1A1_RAT	Elongation factor 1-alpha 1	-	+	-	-	-	-
ECE1_RAT	Endothelin-converting enzyme 1	+	-	-	-	-	-
IF5A1_RAT	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	-	+	-	-	-	-
FETUB_RAT	Fetuin-B	-	+	-	-	-	-
FINC_RAT	Fibronectin	+	+	+	+	+	-
GGH_RAT	Gamma-glutamyl hydrolase	+	+	-	-	-	-

Tab. 7 Proteiny identifikované ve vzorku moči před RD, jeden týden po RD a jeden týden po falešné RD (pokračování).

Identifikační zkratka	Název proteinu	ESI-Q-TOF			MALDI-TOF/TOF		
		Před RD	Po RD	Po falešné RD	Před RD	Po RD	Po falešné RD
GGT1_RAT	Gamma-glutamyltranspeptidase 1	+	+	+	-	-	-
GELS_RAT	Gelsolin	+	+	+	-	+	-
KLK12_RAT	Glandular kallikrein-12, submandibular/renal	+	-	-	-	-	-
KLK7_RAT	Glandular kallikrein-7, submandibular/renal	+	+	+	-	-	-
GRIK4_RAT	Glutamate receptor ionotropic, kainate 4	+	-	+	-	-	-
AMPE_RAT	Glutaryl aminopeptidase	+	-	-	-	-	-
GSTA2_RAT	Glutathione S-transferase alpha-2	+	-	-	-	-	-
GON4L_RAT	GON-4-like protein	+	-	-	-	-	-
GRN_RAT	Granulins	+	-	+	-	-	-
GRAB_RAT	Granzyme B	-	-	+	-	-	-
MCF2L_RAT	Guanine nucleotide exchange factor DBS	+	-	-	-	-	-
HPT_RAT	Haptoglobin	+	+	-	-	-	-
HEMO_RAT	Hemopexin	+	+	+	-	+	-
HD_RAT	Huntingtin	+	-	+	-	-	-
CLIC4_RAT	Chloride intracellular channel protein 4	+	-	-	-	-	-
CHKB_RAT	Choline/ethanolamine kinase	-	-	+	-	-	-
CHD6_RAT	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 6	+	-	-	-	-	-
CHD8_RAT	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8	-	+	+	-	-	-
CTRB1_RAT	Chymotrypsinogen B	+	+	+	-	-	-
IGHG1_RAT	Ig gamma-1 chain C region	-	+	-	-	-	-
IGG2B_RAT	Ig gamma-2B chain C region	-	+	-	-	+	-
KACA_RAT	Ig kappa chain C region, A allele	+	-	-	-	-	-
KACB_RAT	Ig kappa chain C region, B allele	+	+	+	+	-	-

Tab. 7 Proteiny identifikované ve vzorku moči před RD, jeden týden po RD a jeden týden po falešné RD (pokračování).

Identifikační zkratka	Název proteinu	ESI-Q-TOF			MALDI-TOF/TOF		
		Před RD	Po RD	Po falešné RD	Před RD	Po RD	Po falešné RD
KVX01_RAT	Ig kappa chain V region S211	+	-	-	-	-	-
LAC2_RAT	Ig lambda-2 chain C region	+	+	+	-	-	-
IF172_RAT	Intraflagellar transport protein 172 homolog	+	-	-	-	-	-
KLK1_RAT	Kallikrein-1	+	+	+	-	-	-
LAMB2_RAT	Laminin subunit beta-2	-	-	+	-	-	-
LRP2_RAT	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	+	+	-	-	-	-
MUP_RATRT	Major urinary protein (Fragments)	+	+	+	+	+	-
MUP_RAT	Major urinary protein	+	+	+	+	+	+
MDHC_RAT	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	+	+	+	-	-	-
MXRA8_RAT	Matrix-remodeling-associated protein 8	+	-	-	-	-	-
MAGI2_RAT	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 2	+	-	-	-	-	-
MEP1A_RAT	Meprin A subunit alpha	+	+	+	-	+	-
MFA3L_RAT	Microfibrillar-associated protein 3-like	-	+	-	-	-	-
MSH5_RAT	MutS protein homolog 5	+	-	-	-	-	-
MBB1A_RAT	Myb-binding protein 1A	+	-	-	-	-	-
MYH11_RAT	Myosin-11 (Fragments)	-	-	+	-	-	-
NHRF1_RAT	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	+	+	+	-	-	-
RENBP_RAT	N-acylglucosamine 2-epimerase	+	+	+	-	-	-
NEP_RAT	Nepilysin	+	-	-	-	-	-
SLC31_RAT	Neutral and basic amino acid transport protein rBAT	+	-	-	-	-	-
NAMPT_RAT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	+	-	-	-	-	-
NCBP1_RAT	Nuclear cap-binding protein subunit 1	-	+	-	-	-	-

Tab. 7 Proteiny identifikované ve vzorku moči před RD, jeden týden po RD a jeden týden po falešné RD (*pokračování*).

Identifikační zkratka	Název proteinu	ESI-Q-TOF			MALDI-TOF/TOF		
		Před RD	Po RD	Po falešné RD	Před RD	Po RD	Po falešné RD
NUP93_RAT	Nuclear pore complex protein Nup93	+	-	-	-	-	-
DDX21_RAT	Nucleolar RNA helicase 2	+	+	+	-	-	-
NP1L3_RAT	Nucleosome assembly protein 1-like 3	-	-	+	-	-	-
HEM6_RAT	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	-	+	-	-	-	-
AMYP_RAT	Pancreatic alpha-amylase	+	+	-	+	-	-
PALM_RAT	Paralemmin-1	+	-	-	-	-	-
PAR6A_RAT	Partitioning defective 6 homolog alpha	-	+	-	-	-	-
PRVA_RAT	Parvalbumin alpha	-	-	+	-	-	-
DHB4_RAT	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	+	-	-	-	-	-
PK3CB_RAT	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform	+	+	+	-	-	-
PHLD_RAT	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase	-	+	+	-	-	-
PLBL1_RAT	Phospholipase B-like 1	+	-	-	-	-	-
KPRB_RAT	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	+	-	-	-	-	-
PLMN_RAT	Plasminogen	+	+	+	-	-	-
PARP1_RAT	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	+	-	-	-	-	-
PIGR_RAT	Polymeric immunoglobulin receptor	+	-	-	-	-	-
KCNH1_RAT	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 1	+	+	+	-	-	-
KCNS3_RAT	Potassium voltage-gated channel subfamily S member 3	-	-	+	-	-	-
PBAS_RAT	Probasin	+	+	+	+	-	-
EGF_RAT	Pro-epidermal growth factor	+	+	+	+	+	-

Tab. 7 Proteiny identifikované ve vzorku moči před RD, jeden týden po RD a jeden týden po falešné RD (pokračování).

Identifikační zkratka	Název proteinu	ESI-Q-TOF			MALDI-TOF/TOF		
		Před RD	Po RD	Po falešné RD	Před RD	Po RD	Po falešné RD
PTGDS_RAT	Prostaglandin-H2 D-isomerase	+	-	-	-	-	-
KLK6_RAT	Prostatic glandular kallikrein-6	-	-	+	-	-	-
SPBP_RAT	Prostatic spermine-binding protein	+	+	-	-	-	-
PSC2_RAT	Prostatic steroid-binding protein C2	+	+	+	-	-	-
AMBP_RAT	Protein AMBP	+	+	+	+	+	+
F151A_RAT	Protein FAM151A	+	+	-	-	-	-
S10A6_RAT	Protein S100-A6	-	-	+	-	-	-
SMAG1_RAT	Protein Smaug homolog 1	-	+	-	-	-	-
SPNS1_RAT	Protein spinster homolog 1	+	-	-	-	-	-
MICA1_RAT	Protein-methionine sulfoxide oxidase MICAL1	-	-	+	-	-	-
THRB_RAT	Prothrombin	+	+	+	+	-	-
MOS_RAT	Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase mos	+	+	-	-	-	-
KPYM_RAT	Pyruvate kinase PKM	-	+	-	-	-	-
REG3G_RAT	Regenerating islet-derived protein 3-gamma	-	+	-	-	-	-
ARG28_RAT	Rho guanine nucleotide exchange factor 28	+	+	+	-	-	-
UK114_RAT	Ribonuclease UK114	+	+	+	-	-	-
SG2A1_RAT	Secretoglobin family 2A member 1	-	+	-	-	-	-
SG2A2_RAT	Secretoglobin family 2A member 2	+	+	-	-	-	-
SPA3K_RAT	Serine protease inhibitor A3K	+	+	+	+	+	+
SPA3L_RAT	Serine protease inhibitor A3L	+	+	+	-	+	+
SPA3M_RAT	Serine protease inhibitor A3M (Fragment)	+	+	+	-	-	-
SPA3N_RAT	Serine protease inhibitor A3N	-	+	-	-	-	-
TAOK3_RAT	Serine/threonine-protein kinase TAO3	+	-	-	-	-	-

Tab. 7 Proteiny identifikované ve vzorku moči před RD, jeden týden po RD a jeden týden po falešné RD (*pokračování*).

Identifikační zkratka	Název proteinu	ESI-Q-TOF			MALDI-TOF/TOF		
		Před RD	Po RD	Po falešné RD	Před RD	Po RD	Po falešné RD
TRFE_RAT	Serotransferrin	+	+	+	-	+	-
ALBU_RAT	Serum albumin	+	+	+	+	+	+
SAMP_RAT	Serum amyloid P-component	+	+	+	-	-	-
SMR1_RAT	SMR1 protein	+	-	-	-	-	-
SNX27_RAT	Sorting nexin-27	+	+	-	-	-	-
SPTN1_RAT	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	-	-	+	-	-	-
KLK9_RAT	Submandibular glandular kallikrein-9	+	-	+	-	-	-
SODC_RAT	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	+	+	+	+	-	-
SDC2_RAT	Syndecan-2	+	-	+	-	-	-
SDC4_RAT	Syndecan-4	+	-	+	-	-	-
STXB5_RAT	Syntaxin-binding protein 5	+	-	-	-	-	-
TIMD2_RAT	T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 2	+	-	-	-	-	-
TCPE_RAT	T-complex protein 1 subunit epsilon	-	+	+	-	-	-
TCPG_RAT	T-complex protein 1 subunit gamma	+	-	+	-	-	-
TSKS_RAT	Testis-specific serine kinase substrate	+	-	-	-	-	-
THIO_RAT	Thioredoxin	-	+	+	-	-	-
KNT1_RAT	T-kininogen 1	+	-	-	-	-	-
KNT2_RAT	T-kininogen 2	+	+	-	-	-	-
TTHY_RAT	Transthyretin	+	+	+	-	-	-
TFF3_RAT	Trefoil factor 3	-	-	-	-	+	-
TBA1C_RAT	Tubulin alpha-1C chain	-	+	-	-	-	-
PTN20_RAT	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 20	-	+	+	-	-	-

Tab. 7 Proteiny identifikované ve vzorku moči před RD, jeden týden po RD a jeden týden po falešné RD (*pokračování*).

Identifikační zkratka	Název proteinu	ESI-Q-TOF			MALDI-TOF/TOF		
		Před RD	Po RD	Po falešné RD	Před RD	Po RD	Po falešné RD
RL40_RAT	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	-	-	+	-	-	-
UP1_RAT	Urinary protein 1	+	+	+	+	+	+
UP2_RAT	Urinary protein 2	+	+	+	+	-	-
UP3_RAT	Urinary protein 3	+	+	+	+	-	+
UROM_RAT	Uromodulin	+	+	+	+	-	-
USH2A_RAT	Usherin	-	-	+	-	-	-
VGFR2_RAT	Vascular endothelial growth factor receptor 2	+	+	-	-	-	-
VTDB_RAT	Vitamin D-binding protein	+	+	-	-	-	-
CAC1E_RAT	Voltage-dependent R-type calcium channel subunit alpha-1E	+	+	+	-	-	-
WFDC2_RAT	WAP four-disulfide core domain protein 2	-	-	+	-	-	-
ZHX1_RAT	Zinc fingers and homeoboxes protein 1	-	+	-	-	-	-

(+) přítomen, (-) nepřítomen

9.4 Příloha 4 - Tabulka zobrazující proteiny identifikované ve vzorcích moči druhého odběru

Tab. 8 Proteiny identifikované ve vzorku moči jeden měsíc po RD a jeden měsíc po falešné RD.

Identifikační zkratka	Název proteinu	Po RD	Po falešné RD
AFAM_RAT	Afamin	-	+
A1AG_RAT	Alpha-1-acid glycoprotein	-	+
A1AT_RAT	Alpha-1-antitrypsin	+	+
A1M_RAT	Alpha-1-macroglobulin	+	+
FETUA_RAT	Alpha-2-HS-glycoprotein	+	+
AMPN_RAT	Aminopeptidase N	+	+
ANGT_RAT	Angiotensinogen	-	+
APOE_RAT	Apolipoprotein E	-	+
B2MG_RAT	Beta-2-microglobulin	+	+
BGLR_RAT	Beta-glucuronidase	+	+
CADH1_RAT	Cadherin-1	+	+
CALB1_RAT	Calbindin	-	+
CBPQ_RAT	Carboxypeptidase Q	+	+
CATB_RAT	Cathepsin B	-	+
CD48_RAT	CD48 antigen	-	+
CD59_RAT	CD59 glycoprotein	+	+
CBG_RAT	Corticosteroid-binding globulin	+	+
CYTC_RAT	Cystatin-C	+	+
22P1_RAT	Cystatin-related protein 1	+	+
22P2_RAT	Cystatin-related protein 2	+	+
DNAS1_RAT	Deoxyribonuclease-1	+	+
DPP2_RAT	Dipeptidyl peptidase 2	-	+
FINC_RAT	Fibronectin	+	+

Tab. 8 Proteiny identifikované ve vzorku moči jeden měsíc po RD a jeden měsíc po falešné RD (*pokračování*).

Identifikační zkratka	Název proteinu	Po RD	Po falešné RD
GGH_RAT	Gamma-glutamyl hydrolase	+	+
GGT1_RAT	Gamma-glutamyltranspeptidase 1	+	+
GELS_RAT	Gelsolin	-	+
KLK7_RAT	Glandular kallikrein-7, submandibular/renal	+	+
GMEB1_RAT	Glucocorticoid modulatory element-binding protein 1	-	+
AMPE_RAT	Glutamyl aminopeptidase	+	+
GSTA3_RAT	Glutathione S-transferase alpha-3	-	+
HEMO_RAT	Hemopexin	+	+
IGHG1_RAT	Ig gamma-1 chain C region	-	+
IGG2A_RAT	Ig gamma-2A chain C region	-	+
KACA_RAT	Ig kappa chain C region, A allele	-	+
KACB_RAT	Ig kappa chain C region, B allele	+	+
LAC2_RAT	Ig lambda-2 chain C region	-	+
KLK1_RAT	Kallikrein-1	+	+
LRP2_RAT	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	+	+
MUP_RATRT	Major urinary protein (Fragments)	+	+
MUP_RAT	Major urinary protein	+	+
MXRA8_RAT	Matrix-remodeling-associated protein 8	-	+
MEP1A_RAT	Meprin A subunit alpha	+	+
MEP1B_RAT	Meprin A subunit beta	+	+
SLC31_RAT	Neutral and basic amino acid transport protein rBAT	+	+
NGAL_RAT	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	+	-
OBP_RAT	Odorant-binding protein	+	-
AMYP_RAT	Pancreatic alpha-amylase	-	+

Tab. 8 Proteiny identifikované ve vzorku moči jeden měsíc po RD a jeden měsíc po falešné RD (*pokračování*).

Identifikační zkratka	Název proteinu	Po RD	Po falešné RD
PER3_RAT	Period circadian protein homolog 3	+	-
PLMN_RAT	Plasminogen	-	+
PIGR_RAT	Polymeric immunoglobulin receptor	+	+
PBAS_RAT	Probasin	-	+
EGF_RAT	Pro-epidermal growth factor	+	+
PIP_RAT	Prolactin-inducible protein homolog	-	+
PTGDS_RAT	Prostaglandin-H2 D-isomerase	-	+
SPBP_RAT	Prostatic spermine-binding protein	+	+
PSC1_RAT	Prostatic steroid-binding protein C1	+	+
PSC2_RAT	Prostatic steroid-binding protein C2	+	+
AMBP_RAT	Protein AMBP	+	+
THRB_RAT	Prothrombin	+	+
REG3G_RAT	Regenerating islet-derived protein 3-gamma	+	-
RISC_RAT	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	+	-
SG2A2_RAT	Secretoglobin family 2A member 2	+	-
SPA3K_RAT	Serine protease inhibitor A3K	+	+
SPA3L_RAT	Serine protease inhibitor A3L	+	+
SPA3M_RAT	Serine protease inhibitor A3M (Fragment)	+	-
TRFE_RAT	Serotransferrin	+	+
ALBU_RAT	Serum albumin	+	+
SMR1_RAT	SMR1 protein	-	+
KLK9_RAT	Submandibular glandular kallikrein-9	-	+
SODC_RAT	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	+	+
KNT2_RAT	T-kininogen 2	+	+

Tab. 8 Proteiny identifikované ve vzorku moči jeden měsíc po RD a jeden měsíc po falešné RD (*pokračování*).

Identifikační zkratka	Název proteinu	Po RD	Po falešné RD
UP1_RAT	Urinary protein 1	+	+
UP2_RAT	Urinary protein 2	+	+
UP3_RAT	Urinary protein 3	+	+
UROK_RAT	Urokinase-type plasminogen activator	+	+
UROM_RAT	Uromodulin	+	+

(+) přítomen, (-) nepřítomen