

Introducere în proteomul urinar uman

Introduction on the human urinary proteome

Ileana Funduc*

Rezumat

Urina umană este lichidul biologic cel mai utilizat pentru studiul proteomului, datorită colectării sale simple și neinvazive. Rezultatele obținute permit studierea biomarkerilor bolilor renale, cât și a altor tulburări ce determină alterări sistemice ale profilelor metabolice și biochimice care pot afecta excreția proteinelor urinare.

Studiul prezintă etapele prin care trece urina pentru a se obține proteomul urinar uman : colectare, concentrare cu metode chimice și fizice, electroforeză (bidimensională sau capilară), sau cromatografie lichidă și, în final, detectarea și identificarea proteinelor prin spectrometrie de masă.

Direcțiile viitoare sunt îndreptate nu numai asupra fiziologiei renale, patofiziologiei și descoperirii de biomarkeri, ci de asemenea elaborării de noi terapii țintă.

Abstract

Human urine is one of the most used biofluids for proteomics study, because of noninvasiveness and simplicity of specimen collection. The obtained results give the possibility to study biomarkers for kidney diseases as well as other disorders that may have systemic alterations in the metabolic and biochemical profiles that can affect urinary protein excretion. The study presents the stages by which the urine passes to obtain human urinary proteome: collection, concentration with chemical or physical methods, bidimensional or capillary electrophoresis or liquid chromatography and finally detection and identification of proteins by mass spectrometry.

Future directions are focused not only on renal physiology, path physiology and biomarkers discovery, but also on development of new target therapies.

Introducere

Noțiunea de proteom implică analizarea sistematică a proteinelor pentru identitatea, cantitatea și funcția lor¹⁰. Urina umană este una dintre cele mai interesante lichide biologice pentru studiul proteomului, recoltarea sa fiind simplă și neinvazivă. Proteomul urinar nu conține numai proteine plasmatice, ci și proteinele

rinichiului. Excreția proteinelor urinare reflectă sensibil tulburările renale⁵. Măsurarea doar a concentrației totale de proteine urinare poate fi, de cele mai multe ori, insuficientă pentru înțelegerea unei condiții patofiziologice¹⁹. Proteomul urinar, în schimb, permite analizarea simultană a variațiilor calitative și cantitative a fiecărui membru dintr-o populație definită de proteine, expresia proteică diferențială între starea nor-

***Adresa de corespondență:** Ileana Funduc, Barajul Uzului 2, bl.Y16, sc.A, apt.18, Sector 3, 032796 București
Tel./Fax 0213407668, mobil: 0724210670, E-mail: ifunduc@yahoo.com

mală și de boală. În acest fel există posibilitatea identificării de componenți proteinici care să ajute la înțelegerea patogenezei bolii, a sugerării de biomarkeri pentru bolile rinichiului și a altor tulburări ce pot avea alterări sistemice în profilele metabolice și biochimice care afectează excreția proteinelor urinare, cât și de ținte terapeutice¹⁸. Studiarea proteomului renal începută în 1995 de către Witzmann și col.²¹ care au identificat proteinele de stress renal ca biomarkeri pentru toxicitatea chimică, a continuat cu analiza proteomică a urinii un an mai târziu de către Marshall și Williams⁸. Noua eră a spectroscopiei de masă a determinat apoi pe Patterson și col.¹³ în 2001 să identifice componenții proteomului urinar folosind lichid cromatografia cuplată cu spectrometria de masă tandem, după care studiile s-au înmulțit.

Metodologie

Colectarea probei

Există o multitudine de factori ce afectează compoziția urinii colectate¹⁷ și anume:

- momentul colectării
- hrana ingerată
- lichidele consumate
- medicamentele administrate
- activitatea zilnică
- exercițiile fizice
- stressul
- ciclul menstrual
- diverse stări fiziologice
- temperatura ambiantă
- diverși alți factori de mediu
- sexul (bărbatul prezintă un număr de

spoturi de proteină mai mic decât femeia; urina de bărbat prezintă o concentrație de albumină și de transferină mai mică decât a femeii)

Prepararea probei

Urina umană normală are o concentrație mică de proteine (<150 mg/l), conținut de

săruri și de resturi metabolice crescut, care interferează în special electroforeza cu focalizare izoelectrică. Concentrarea urinii nu este necesară pentru electroforeza capilară și spectrometria de masă²⁰, dar este crucială pentru electroforeza bidimensională în poliacrilamidă¹⁶.

Modalitățile de concentrare a urinii implică:

- precipitare (etanol, metanol, acetonă, acetonitril, acid acetic, acid tricloracetic)^{5,14,16} sau îmbogățire cu paturi sau coloane de afinitate^{3,14}, pentru separare chimică;
- liofilizare^{4, 9,13}, ultracentrifugare¹⁵, filtrare centrifugală^{9,11,16}, pentru separare fizică.

Teoretic, o proteină dintr-o soluție tinde să precipite, când pH-ul soluției este identic sau se apropie de punctul izoelectric al proteinei. Folosind diverse procedee de precipitare, pentru o urină cu aceeași cantitate de proteine totale, pe electroforeză se vizualizează un număr diferit de spoturi.

Chiar în cazul aceluiași precipitant, diferitele sale concentrații dau rezultate diferite. De exemplu, în cazul precipitării cu etanol, cea mai potrivită concentrație este de 66%.

Este de preferat precipitarea cu etanol, metanol sau acetonă, acetonitrilul folosindu-se doar în cazurile unei proteinurii crescute. Acetona se poate combina pentru precipitare cu diverși acizi, dar cu alți solvenți organici are probleme de solubilitate.

Numărul spoturilor de pe electroforeza bidimensională diferă, de asemenea, în cazul diverselor variante de concentrare cu metode fizice.

Ultrafiltrarea cu pretratament de Triton X 100 este superioară precipitării cu acetonă⁵ deoarece:

- prin ultrafiltrare se solubilizează proteinele hidrofobice ce includ receptorii și proteinele canal, care sunt proteine de membrană tipice, a căror extracție este importantă pentru studiul fiziologiei renale⁶;
- nu se precipită sărurile urinare și deșeurile metabolice ce pot interfera cu redizolvarea

proteinelor urinare, iar benzile cu aglomerări de proteine mai mari de 200 kDa și complexe insolubile de proteine se pot vizualiza pe gel;

- se recuperează proteinele cu masă moleculară scăzută.

Pentru îndepărtarea sărurilor și a substanțelor ce interferă, se recomandă dializa după precipitare. Rezoluția spoturilor este superioară la o urină dializată față de o urină nedializată.

Protocoalele de precipitare se pot combina, iar dacă acestea se combină și cu filtrarea centrifugală, liofilizarea și ultrafiltrarea, se ajunge să se obțină aproape 700 spoturi pe electroforeza bidimensională²⁰.

Totuși, concluzia în urma celor arătate la prepararea probei este: "cu cât sunt mai multe trepte de preparare, pierderea de proteine este mai mare".

Electroforeza în gel

Electroforeza bidimensională a proteinelor urinare implică focalizarea izoelectrică în prima direcție (ar permite separarea pe baza punctelor izoelectrice) și în a doua direcție - electroforeza în poliacrilamidă, când separarea are loc pe baza maselor moleculare. Spoturile obținute se colorează, se taie de pe gel și se identifică. Metoda are limite și anume^{6,7}:

- Este incompatibilă datorită detergentului ionic (sodiu dodecil sulfat), care cere solubilizarea completă a proteinelor și desface complexe proteice; proteinele hidrofobe (în special proteinele de membrană integrale) deseori nu intră în gel.

- Rezolvarea separării pe baza maselor moleculare este limitată: se elimină proteinele foarte mari și foarte mici. De asemenea, se pot pierde și proteinele foarte acide și foarte bazice. Există tendința proteinelor de mare abundență de a le acoperi pe cele de joasă abundență, care pot juca roluri regulatorii critice într-un țesut.

- Reproducibilitatea este limitată.

Colorarea proteinelor separate prin electroforeză se face cu Coomassie Brilliant Blue R250 sau cu coloranți mai sensibili ca ar-

gintul, SPYRO Ruby, Deep Purple. Proteinele prezintă diferite afinități pentru diverși coloranți.

În afară de electroforeza bidimensională, separarea proteinelor se mai poate realiza cu ajutorul electroforezei capilare¹⁸ sau a cromatografiei lichide, după ce are loc digestia enzimatică și fomarea de fragmente peptidice. Cromatografia lichidă, în afara faptului că este mai rapidă, elimină limitele electroforezei bidimensionale și realizează rezoluții neatinse de gel. Una din abordările descrise este identificarea multidimensională a proteinelor (Mud PIT), care folosește un schimbător puternic de cationi, urmată de cromatografie în fază reversă²².

Detectare, identificare

Spoturile de pe electroforeză, supuse digestiei cu tripsină sunt identificate prin spectrometrie de masă. Uzual, identificarea se realizează prin fingerprintingul, masei peptidice (PMF) prin care proteinele se digeră enzimatic și spectrul de masă al fragmentelor de peptide rezultat permite identificarea lor¹⁸. Spectrometria de masă tandem permite proteinelor specifice dintr-un spectru inițial să fie selectate, izolate și fragmentate, să li se deducă secvența aminoacidică și să se identifice proteina mamă².

O altă variantă de tehnologie modernă a proteomului constă în prefracționarea probei pe chipsuri proteice special destinate^{2,12,18} care capturează proteinele și peptidele specifice, care se vizualizează apoi prin spectrometrie de masă. Această variantă ușurează screeningul unui număr mare de probe de urină pentru biomarkeri potențiali, spre deosebire de spectrometria de masă tandem ce nu permite identificarea nici unui biomarker potențial. Spectrele obținute în final după spectrometria de masă diferă de la normal la patologic.

Ca un corolar al complexității tehnologiei proteomului, Vidal și col.¹⁸ au făcut o analogie între strategiile analitice pentru realizarea proteinelor urinare și identificarea bagajului unui pasager care călătorește cu avionul.

În prima variantă metodologică, un spot individual observat pe electroforeza bidimensională și care reprezintă o singură proteină, se digerează enzimatic în peptide. Urmează apoi etapa spectrometriei de masă (fingerprintingul de masă peptidică) care identifică proteina respectivă, respectiv bagajul propriu. În cea de a doua variantă, amestecul de proteine se digerează enzimatic pentru a genera fragmentele peptidice a proteinelor din probă, analog stării bagajelor din cargoul avionului. Prin etapa cromatografică ce urmează, peptidele sunt sortate după o proprietate specifică, eluându-se la diverși timpi, ca și bagajele de pe un carusel. Acestea sunt culese individual pentru determinarea secvențială care se realizează prin spectroscopia de masă tandem. Proteinele sunt apoi identificate din amestecul complex, în același fel cum fiecare pasager așteaptă identificarea și colectarea bagajului din multitudinea existentă pe banda rulantă.

Aplicații clinice

Analiza proteomului urinar care a urmărit identificarea biomarkerilor s-a aplicat deja în¹:

- cancerul de prostată;
- carcinomul de celulă renală;
- cancerul de vezică;
- carcinomul urotelial;
- sindromul Fanconi;
- carcinomul celular tranzițional;
- diabet de tip I;
- rejeta acut de allogrefă renală.

Perspective de viitor

În viitor este necesară definirea completă a expresiilor proteomice ale diferitelor compartimente (țesut, urină) în contextele de sănătate și de boală, urmată de posibilitatea cuantificării de rutină a acestora. Ca urmare s-ar putea crea și platformele diagnostice pentru

aplicarea lor de către clinicieni¹⁸.

Expresia proteomică a urinei umane este îndreptată nu numai asupra fiziologiei renale, patofiziologiei sau a descoperirii de biomarkeri, ci de asemenea asupra dezvoltării de noi terapii țintă. Sigur că nu un singur biomarker urinar are suficientă sensibilitate și specificitate pentru a fi util clinic, ci orice nou biomarker va fi o parte din “panelul de biomarkeri”². Este necesară existența unui test diagnostic, așa-numitul “standard de aur” bine definit față de care să se compare fiecare biomarker. Totodată, o treaptă importantă o constituie și generarea anticorpilor specifici biomarkerilor.

Metodologia de analiză a proteomului este cheia marilor promisiuni privind cercetarea fundamentală renală și a nefrologiei clinice.

Bibliografie

1. Adachi J., Kumar C., Zhang Y. et al. - The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins – *Genome Biology*, 2006; 7: R80.
2. Barratt J., Topham P. – Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease – *Canad Med Assoc J*, 2007; 177(4): 361-8.
3. Castagna A., Cecconi D, Sennels L. et al. - Exploring the hidden human urinary proteome via ligand library beads – *J Proteome Res*, 2005; 4:1917-30.
4. Davis M.T., Spahr C.S., McGinley M.D. et al. – Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. II. Limitation of complex mixture analyses – *Proteomics*, 2001;1:108-117.
5. Fujimoto T., Miya M., Machida M. et al. – Improved of human urinary protein for electrophoresis- *J of Health Science*, 2006; 52(6): 718-23.
6. Klein J.B., Thongboonkerd V. (eds) – Overview of Proteomics – *Contrib Nephrol Basel*, Karger, 2004; 141:1-10.
7. Knepper M.A. – Proteomics and the kidney – *J Am Soc Nephrol.*, 2002; 13: 1398-1408.
8. Marshall T, Williams K. – Two-dimensional electrophoresis of human urinary proteins following

concentration by dye precipitation – Electrophoresis, 1996; 17 : 1265-72.

9. Oh J., Pyo J.H., Jo E.H. et al. – Establishment of near-standard two-dimensional human urine proteomic map – Proteomics, 2004; 4: 3485-97.

10. Peng J., Gygi S.P. – Proteomics: The move to mixturer – J Mass Spect, 2001;36:1083-01.

11. Pieper R., Gatlin C.L., McGrath A.M. et al. – Characterization of the human urinary proteome : a method for high-revolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots – Proteomics, 2004; 4: 1159-1174.

12. Roelofsen H., Alvarez-Llamas G, Schepers M. – Proteomics profiling of urine with surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry – Proteome Science, 2007 ;5:2.

13. Spahr C.S., Davis M.T., McGinley et al – Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. I. Profiling an unfractionated tryptic digest – Proteomics, 2001; 1 : 93-107.

14. Tantipaboonwong P., Sinchaikul S., Sriyam S. et al. – Different techniques for urinary protein analysis of normal and lung cancer patients – Proteomics, 2005; 5: 1140-49.

15. Thongboonkerd V., McLeish K.R., Arthur J.M., et al. – Proteomic analyses of normal human

urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation – Kidney Int., 2002; 62:1461-69.

16. Thongboonkerd V., Klein E., Klein J.B. – Sample preparation for 2-D proteomic analysis – Contrib Nephrol, 2004;141:11-24.

17. Thongboonkerd V., Chutipongtanate S., Kanlaya R. – Systematic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics : quantity, quality and variability – J of Proteome research, 2006; 5(1): 183-91.

18. Vidal B.C., Bonventre V., I-Hong Hsu S.- Towards the application of proteomics in renal disease diagnosis – Clin Science, 2005;109:421-30.

19. Waller K.V., Ward K.M., Mahan J.D. et al. – Current Concepts in Proteinuria – Clin Chem, 1989; 35:755-65.

20. Weissinger E.M., Wittke S., Kaiser T. et al. – Proteomic patterns established with capillary electrophoresis and mass spectrometry for diagnostic purposes – Kidney Int, 2004; 65:2426-34.

21. Witzmann F., Clack J., Fultz C., et al. – Two-dimensional electrophoretic mapping of hepatic and renal stress proteins – Electrophoresis, 1995; 16: 451-59.

22. Wolters D., Washburn M.P., Yates, III, J.R. – An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics- Anal Chem 2001;73:5683-90.