

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni



Autoreferát dizertační práce

**ANALÝZA A IDENTIFIKACE PROTEINŮ PŘI ORGÁNOVÝCH
DYSFUNKCÍCH POMOCÍ PROTEOMICKÝCH METOD**

**ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF PROTEINS IN ORGAN
DYSFUNCTION USING PROTEOMIC METHODS**

Zdeněk Tůma

Plzeň 2016

Dizertační práce byla vypracována v rámci kombinované formy doktorského studijního programu v oboru studia Vnitřní nemoci na 1. Interní klinice LF UK v Plzni.

Uchazeč: Ing. Zdeněk Tůma

Školitel: Prof. MUDr. Martin Matějovič, PhD., přednosta I. interní kliniky FN v Plzni a LF UK v Plzni

Konzultant:

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba dizertační práce před komisí pro obhajobu dizertačních prací studijního programu

Vnitřní nemoci

se koná dne:

Místo obhajoby:

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy v Praze, Husova 3, Plzeň.

Prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc., předseda komise pro obhajobu dizertačních prací studijního programu Vnitřní nemoci

Obsah

1. ÚVOD A SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	5
1.1. Biologické vzorky využitelné pro proteomiku	5
1.2. Analytické metody v proteomice.....	7
1.3. Využití a potenciál proteomiky v medicíně.....	9
2. PŮVODNÍ PRÁCE.....	10
2.1. Původní vědecké práce	10
2.2. Původní přehledové práce.....	11
2.3. Práce navazující na studovanou problematiku	11
3. LEGÁLNÍ A ETICKÉ ASPEKTY STUDIÍ.....	12
4. CÍLE STUDIÍ.....	12
5. EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE.....	13
5.1. Analýza proteomu mitochondrií v ledvinách (studie I).....	13
5.2. Proteom plazmy v časně fázi sepse (studie II)	14
5.3. Proteom tkáně ledvin v průběhu sepse (studie III)	15
6. KLINICKÉ STUDIE	17
6.1. Interaktom systému pro náhradu funkce jater (studie IV).....	17
6.2. Analýza interakce krve s kapilárami dialyzátorů (studie V)	18
6.3. Proteomická analýza aktivace komplementu při kontaktu krve s kapilárami dialyzátorů (studie VI).....	19
7. ZÁVĚRY	21
7.1. Experimentální studie	21
7.2. Klinické studie.....	21
8. LITERATURA	22

Souhrn

Proteomika se zabývá hromadným studiem proteinů a jejich vlastností, především struktury a funkce. V medicíně bývá využívána pro analýzu fungování tkání a orgánů ve zdraví a nemoci a hledání biomarkerů. Metody zahrnují přípravu vzorku, separační techniky a hmotnostní spektrometrii. Protože neexistuje univerzální metoda pro analýzu libovolného biologického vzorku, proto analytické techniky vyžadují optimalizaci pro konkrétní typ vzorku a požadované výstupy.

Cílem práce bylo vytvořit metodické postupy a vyhodnotit proteomické výsledky ve dvou výzkumných rovinách: experimentální a klinické. První část práce obsahuje experimenty využívající proteomiku pro studium změny proteomu plazmy v klinicky relevantním prasečím modelu sepse vyvolané peritonitidou. Proteomické analýzy byly rovněž výchozí metodologickou strategií v experimentech zaměřených na fyziologii ledvin a patofyziologii akutního poškození ledvin v průběhu sepse. Analýzou biopsií ledvin byl sledován časový průběh změn proteomu způsobený sepsí a chirurgickým zásahem. Ve druhé části dizertační práce jsou zahrnuty práce zabývající se biokompatibilitou mimotělních očišťovacích metod. Byla připravena metoda pro analýzu proteinů interagujících s povrchem kapilár hemodialyzátorů a s adsorbenty systému náhrady funkce jater. Analýzou proteinů adsorbovaných na polysulfonové kapiláry dialyzátorů byla identifikována aktivace komplementu jako proces významný v biokompatibilitě dialyzátorů.

Summary

Proteomics is the large-scale study of proteins, particularly their structures and functions. Proteomics has been utilized in medicine for investigation of disease mechanisms and biomarker discovery. Instrumental methods cover sample preparation, protein and peptide separation and mass spectrometry. At present, there is no proteomic method that can be used as universal for every sample. Analytical methods need to be adapted and optimized for certain samples.

The aim of this work was to create methodic procedures and to interpret results of experimental and clinical research. The first part of the thesis includes experiments utilizing proteomics to study changes in the plasma proteome clinically relevant porcine model of sepsis-induced peritonitis. Proteomic analyzes were also starting methodological strategies in experiments aimed at kidney physiology and pathophysiology of acute kidney injury during sepsis. Renal biopsies were analyzed in order to study the time course of proteome changes caused by sepsis and surgery. The second part of the thesis contains experiments studying biocompatibility. A method for elution of proteins interacting with adsorbents used in extracorporeal liver support system and with hemodialyzer capillaries was prepared. Analysis of proteins adsorbed to polysulfone capillaries identified complement activation as an important process involved in hemodialyzer biocompatibility.

1. ÚVOD A SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Dysfunkce orgánů jsou komplexní a závažné stavy nastávající v důsledku akutních a chronických onemocnění. Porozumění mechanismům, identifikaci biomarkerů a validace účinků léčby může pomoci k vývoji specifické léčby a zlepšení prognózy pacientů [1].

Proteomika je soubor technik, přístupů a konceptů, které usilují o kvantitativní a kvalitativní popis a porovnání proteomu. Jako proteom se označuje kompletní sada proteinů včetně jejich izoform a posttranslačních modifikací nacházející se v konkrétním okamžiku v daném organismu, tkáni nebo buňce. Moderní proteomické technologie umožňují identifikaci a kvantitativní hodnocení v ideálním případě všech proteinů přítomných ve vzorku a umožňují získat více informací, než metody zaměřené na sledování definované sady analytů [2].

Proteomika se snaží analyzovat strukturu a kvantitu ideálně všech proteinů obsažených v konkrétním okamžiku v daném organismu, tkáni nebo buňce. Využívá k tomu biochemické separační metody, hmotnostní spektrometrii a bioinformatické nástroje. V současnosti neexistuje jedna univerzální proteomická metoda aplikovatelná na jakýkoliv biologický materiál a je proto nezbytné vybrat a přizpůsobit z mnoha způsobů přípravy vzorku, separačních a hmotnostně spektrometrických metod ty, které poskytnou optimální výsledky vzhledem ke studovanému problému.

Vynález ionizačních technik schopných ionizovat velké, netěkavé a termolabilní molekuly proteinů a peptidů [3, 4] umožnil využití hmotnostní spektrometrie k analýze struktury proteinů a posttranslačních modifikací. V současnosti jsou používány a rozvíjeny metody kvantitativní analýzy proteomů pomocí hmotnostní spektrometrie. Jejich parametry jsou dostatečné k tomu, aby bylo možné kvantifikovat proteiny s dostatečnou specificitou v komplexních směsích v dynamickém rozsahu až 5 řádů [5].

V současnosti se proteomika v medicíně uplatňuje v oblastech výzkumu fyziologie tkání, orgánů ve zdraví a nemoci, hledání a validaci biomarkerů, a pro vývoj nových léků. Při výzkumu fyziologického a patofyziologického fungování tkání a orgánů je snaha identifikovat co nejvíce proteinů přítomných v daném systému, prozkoumat jejich strukturu a vzájemné interakce a navrhnout fungování metabolických drah. Pomocí metod pro relativní kvantifikaci je možné porovnat expresi proteinů mezi několika stavy, případně v různých časových okamžicích. Nástroje bioinformatiky umožňují zasadit výsledky do kontextu a navrhovat modely fungování metabolických drah. V případě hledání biomarkerů je podstatnou částí standardizace metod, kvantifikace relativní i absolutní pomocí syntetických vnitřních standardů. Aplikace proteomiky při experimentech na modelových organismech pak může přispět k pochopení mechanismů chorob, k identifikaci biomarkerů a testování nových způsobů léčby.

Proteomika urazila cestu od publikování seznamů identifikovaných proteinů k detailní vysokovýkonné kvantitativní charakterizaci proteomů a integraci s dalšími metodami (např. genomika [6], metabolomika [7]).

1.1. Biologické vzorky využitelné pro proteomiku

Pro proteomickou analýzu jsou využívány tkáně a tělní tekutiny. Z rozdílné struktury a chemického složení tkání a tělních tekutin, chemického složení a dynamického rozsahu koncentrací proteinů v tkáních a tělních tekutinách vyplývá nutnost využití širokého spektra analytických metod pro úspěšnou proteomickou analýzu.

1.1.1. Tělní tekutiny

Tělní tekutiny představují důležitý zdroj proteinů s nižší invazivitou odběru oproti tkáňovým vzorkům. Pomocí proteomiky bylo analyzováno široké spektrum tělních tekutin [8-10].

Proteom plazmy zahrnuje kromě abundantních proteinů (např. albumin, transferin) také proteiny vylučované tkáněmi, imunoglobuliny, proteinové a peptidové hormony a cytokiny. Proteom plazmy a séra je ovlivněn mnoha preanalytickými faktory, zejména volbou antikoagulantu, variabilitou času srážení, hemolýzou, rychlostí a časem centrifugace, teplotou uložení a opakovanými cykly zmrazení a rozmrazení vzorku [11]. Sérum je kvalitativně odlišné od plazmy v tom, že převážná část fibrinogenu je přeměněna na sraženinu fibrinu a spolu s destičkami odstraněna. Proteom séra je ovlivněn zejména dobou srážení, rychlostí odstředování odstranění fibrinové sraženiny, a teplota skladování a použitými zkumavkami pro sběr materiálu [12]. Rozsah koncentrací individuálních proteinů v plazmě dosahuje 10-12 řádů a abundantní proteiny plazmy (např. albumin, transferin) představují více než 99% hmotnostního podílu proteinů v plazmě. Techniky odstraňující abundantní proteiny jsou využívány pro zlepšení detekce biomarkerů v plazmě [13].

Moč obsahuje proteiny po ultrafiltraci plazmy a proteiny pocházející z orgánů účastnících se na její tvorbě a vylučování. Proteom moči poskytuje informace o fyziologii a patofyziologii ledvin, a může být využit pro detekci biomarkerů chorob ledvin [14]. Přítomnost abundantních proteinů znesnadňuje detekci proteinů s nízkými koncentracemi [15]. Složení proteomu moči se mění v závislosti na čase odběru, dietě, tělesné zátěži a zdravotním stavu [16]. Zpracování moči před proteomickou analýzou obvykle vyžaduje odstranění iontů solí pomocí SPE, precipitace nebo dialýzy [10]. Významný zdroj biomarkerů představují také peptidy v moči [17].

Hemodialyzát a ultrafiltrát z mimotělních očišťovacích metod mohou poskytnout informaci o uremických toxinech hromadících se v krvi při poruše funkce ledvin [18]. Tyto roztoky vyžadují zakoncentrování a odstranění elektrolytů např. dialýzou nebo precipitací organickými rozpouštědly.

1.1.2. Tkáň

Analýzou tkání můžeme zachytit změny metabolických a signálních drah způsobené nemocí a vytipovat proteiny vhodné jako cíle terapie. Získání tkáně je invazivní proces a dostupnost vzorků tkání od pacientů je tedy omezená. S vývojem citlivějších analytických metod je možné analyzovat biopsie [19].

Zpracování zahrnuje homogenizaci tkáně a extrakci proteinů. Použité metody do jisté míry závisí na analytické technice použité pro další práci. V případě zkoumání rozpustných proteinových komplexů je nutné pracovat s detergenty, které jsou schopny solubilizovat komplexy bez disociace (např. N-dodecyl-beta-D-maltosid). Pro většinu aplikací využívajících dvojrozměrné elektroforézy jsou využívány pufrы obsahující denaturující a redukční činidla [20]. Membránové proteiny jsou obtížně dostupné a pro jejich získání jsou nutné komplikované solubilizační postupy [21]. Při přípravě vzorku pro metody založené na spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie pak je cílem proteolyticky rozštěpit proteiny vzorku na peptidy s co největším účinkem [22]. Techniky pro zpracování velmi malých množství vzorků s řádově mikrogramovými množstvími proteinů mohou umožnit analýzu proteomu tkáňových biopsií [23].

1.1.3. Subcelulární organely

Protože počet individuálních proteinů a dynamický rozsah jejich koncentrací překračuje možnosti stávajících analytických metod, proto je vhodné snížit komplexitu vzorku. Častým způsobem je izolace subcelulárních organel [24]. Analýzou izolovaných organel lze dosáhnout lepšího pokrytí jejich proteomu, protože jsou odstraněny abundanční proteiny (např. cytoplazmy). Příkladem hojně používaného postupu je separace mitochondrií pomocí diferenciální centrifugace. Pomocí série centrifugačních kroků sedimentují jednotlivé organely [25]. Separace organel byla zatím využita při analýze proteomu mitochondrií [26], peroxisomů [27], buněčného jádra [28] a mikrosomů [29]. Při analýzách proteomů takto izolovaných subcelulárních organel jsou často nacházeny proteiny pocházející z jiných organel. Jsou známy případy spojení organel, např. membrány asociované s mitochondriemi (mitochondria associated membranes, MAM), kdy pomocí proteinových komplexů dochází ke spojení mitochondrií a endoplazmatického retikula [30]. Metody a aplikace proteomiky na analýzu mitochondrií v ledvinách jsou shrnuty v přehledovém článku VII.

1.2. Analytické metody v proteomice

Proteomika spoléhá na spojení separačních metod, hmotnostní spektrometrie a bioinformatických přístupů pro analýzu dat. V separačních metodách využívaných proteomikou jsou hojně zastoupeny gelové elektroforézy a kapalinová chromatografie. Pro hmotnostní spektrometrii jsou vyvíjeny spektrometry, které umožňují stále rychlejší identifikaci a citlivější detekci proteinů.

1.2.1. Metody založené na gelových elektroforézách.

Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE) je kombinací separaci pomocí izoelektrické fokusace (IEF) a elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) představuje jednu z hojně používaných technik. Po vizualizaci pomocí barviva selektivně se vázajícího na molekuly proteinů se proteiny zobrazí jako skvrny, jejichž poloha na gelu je určena hmotností a izoelektrickým bodem daného proteinu a intenzita skvrny je pak úměrná množství proteinu. Po zpracování více vzorků lze pomocí specializovaných programů porovnávat intenzitu skvrn mezi jednotlivými gely a tím zjistit, relativní změnu abundance jednotlivých proteinů [31]. Začlenění vnitřního standardu do elektroforetické separace zvyšuje reprodukovatelnost. Uspořádání DIGE, kdy vzorky a vnitřní standard jsou označeny fluorescenčními barvivy a separovány na jednom gelu, zvyšuje reprodukovatelnost separace [32]. Mezi další metody využívající separaci na gelu patří nativní elektroforéza (BN-PAGE). Principem je separace v přítomnosti barviva Coomassie, které se reverzibilně váže na proteiny a uděluje jim záporný náboj. Touto separací je možné získat nativní proteinové komplexy a zkoumat jejich podjednotkové složení [33]. Identifikace vybraných proteinů může pak být provedena pomocí proteolytického štěpení proteinů v gelu [34] a analýzy vzniklých peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie [35].

1.2.2. Metody založené na kapalinových chromatografiích

Postupy využívající on-line spojení kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru jsou používány s rostoucí tendencí. Proteiny jsou bez předchozí separace podrobeny proteolytickému štěpení, vzniklé peptidy jsou separovány kapalinovým chromatografem. Následně jsou okamžitě analyzovány hmotnostním spektrometrem

připojeným na výstup chromatografické kolony. Akvizice fragmentačních spekter je klíčová pro identifikaci a kvantifikaci proteinů [36]. Pro složité směsi proteinů, byly vyvinuty metody využívající vícerozměrné chromatografické separace [37].

1.2.3. Využití proteinových čipů

Proteinové čipy představují rychlou metodu pro analýzu velkého množství analytů současně [38]. Proteinové čipy mají využití při sledování změn exprese proteinů, protein-proteinových interakcí, hledání a validaci biomarkerů [39]. Metody využívající detekci pomocí hmotnostního spektrometru (Surface Enhanced Laser Desorption and Ionization, SELDI), využívají různé typy povrchů, na nichž jsou zachytávány proteiny požadovaných vlastností, které jsou pak analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru. Jejich využití je pro hledání a validaci biomarkerů [40].

1.2.4. Hmotnostní spektrometrie v proteomice

S vynálezem a rozvojem tzv. měkkých ionizačních technik ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI) [3] a ionizace elektrospřejem (ESI) [4] bylo možné využít hmotnostní spektrometrii pro studium struktury biomolekul včetně proteinů. Hmotnostní spektrometrie je využívána pro analýzu aminokyselinové sekvence proteinů včetně případných posttranslačních modifikací a pro kvantitativní analýzy.

Metoda peptidového mapování (peptide mass fingerprinting, PMF) je nejčastěji používaná pro proteiny separované pomocí gelových elektroforéz. Gelové skvrny obsahující protein jsou specificky štěpeny proteázou a změřené hmotnosti těchto peptidů jsou porovnávány s hmotnostmi peptidů odvozených ze známých sekvencí proteinů [35]. Tandemová hmotnostní spektrometrie spočívá ve fragmentaci peptidového prekurzoru a měření hmotnosti fragmentů, které pak poskytnou detailní informace o aminokyselinovém složení peptidu a případných modifikacích [41].

Při využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie je fragmentace peptidů pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie klíčová jak pro identifikaci proteinů, tak i pro jejich kvantifikaci [42]. Značení proteinů nebo peptidů pomocí izotopických sloučenin je prováděno před separací a hmotnostně spektrometrickou analýzou [43]. Postupy využívající MS data bez značení sledují intenzitu signálu prekurzoru nebo počet fragmentačních spekter daného peptidu jako míru relativní kvantity [44].

Pro identifikaci proteinů jsou po změření hmotnostního spektra vybrány prekurzory s intenzitou nad určitým prahem, je spuštěna jejich fragmentace a zaznamenána data [45]. Metody využívající fragmentaci prekurzorů v širším rozsahu hmotností (např. sekvenční akvizice všech fragmentových spekter, SWATH) umožňují zachytit teoreticky fragmenty všech peptidů, které vstupují do hmotnostního spektrometru. Výsledkem jsou digitální mapy fragmentačních spekter, které lze opakovaně interpretovat [46]. Hmotnostně spektrometrickými metodami monitorování vybraných reakcí (SRM/MRM) lze cíleně stanovit peptidy s velmi vysokou citlivostí, která je na úrovni detekce pomocí imunochemických metod [47]. Absolutní kvantifikace pomocí hmotnostní spektrometrie je možná s použitím izotopově značeného syntetického peptidu jako vnitřního standardu [44].

1.3. Využití a potenciál proteomiky v medicíně

Jednou z oblastí je zjišťování mechanismu chorob a působení toxických látek. Analýza proteomu zachytí údaje o změně zastoupení proteinů v průběhu patologického stavu. Ze změn expresí proteinů zapojených v metabolických drahách lze usuzovat na jejich průběh, aktivaci nebo potlačení [48]. Pomocí bioinformatických nástrojů je možné proteiny se změněnou expresí graficky přímo „mapovat“ nebo přiřadit do známých metabolických a regulačních drah a tak vytvářet modely metabolismu při patologických stavech [49]. Další zpřesnění mechanismů a modelů metabolických drah lze dosáhnout kombinací proteomických a metabolomických dat [50]. Schopnost proteomiky v rychlém, přesném a reprodukovatelném kvantifikaci velkého množství proteinů může přispět k realizaci personalizované medicíny tím, že poskytne výkonné diagnostické přístupy založené na monitorování molekulárních fenotypů pacientů [51].

Proteomika má velký potenciál v hledání biomarkerů. S tím kontrastuje fakt, že dosud velmi málo markerů nalezených pomocí proteomiky je využíváno pro klinickou diagnostiku [52]. Příčinou mohou být nedostatky v designu dosud provedených proteomických studií. Při provádění proteomických analýz zaměřených na identifikaci biomarkerů je klíčové naplánovat kroky analýzy (definice klinického problému, sběr a zpracování vzorků, získání a analýza dat a validace výsledků) [53]. S rozvojem technologie hmotnostních spektrometrů a zlepšováním jejich citlivosti a reprodukovatelnosti je rozvíjeno využití hmotnostní spektrometrie namísto imunochemických metod pro validaci proteinových biomarkerů [54]. Studie využívající proteomiku pro výzkum biomarkerů lze najít v širokém spektru oborů [55-57]. Velkou oblast představují studie zabývající se výzkumem biomarkerů karcinomů [58].

2. PŮVODNÍ PRÁCE

Tato dizertační práce vychází z komentovaného souboru původních experimentálních prací a přehledového článku, jejichž seznam je uveden níže.

2.1. Původní vědecké práce

2.1.1. Experimentální

- I. TŮMA, Zdeněk; KUNCOVÁ, Jitka; MAREŠ, Jan; MATĚJOVIČ, Martin. Mitochondrial proteomes of porcine kidney cortex and medulla: foundation for translational proteomics. *Clin Exp Nephrol.* 2016, 20, s. 39-49. **IF 2,020**
- II. THONGBOONKERD, Visith; CHIANGJONG, Wararat; MAREŠ, Jan; MORAVEC, Jiří; TŮMA, Zdeněk; KARVUNIDIS, Thomas; SINCHAIKUL, Supachok; CHEN, Shui-Tein; OPATRNÝ, Karel Jr.; MATĚJOVIČ, Martin. Altered plasma proteome during an early phase of peritonitis-induced sepsis. *Clin Sci (Lond)*, 2009, 116, s. 721-730. **IF 5,598**
- III. MATĚJOVIČ, Martin; TŮMA, Zdeněk; MORAVEC, Jiří; VALEŠOVÁ, Lenka; SÝKORA, Roman; CHVOJKA, Jiří; BENEŠ, Jan; MAREŠ, Jan. Renal proteomic responses to severe sepsis and surgical trauma: dynamic analysis of porcine tissue biopsies. *Shock*, 2016, doi 10.1097/SHK.0000000000000613. **IF 3,045**

2.1.2. Klinické

- IV. MAREŠ, Jan; THONGBOONKERD, Visith; TŮMA, Zdeněk; MORAVEC, Jiří; MATĚJOVIČ, Martin. Specific adsorption of some complement activation proteins to polysulfone dialysis membranes during hemodialysis. *Kidney international.* 2009, 76, s. 404-413. **IF 8,563**
- V. MAREŠ, Jan; RICHTROVÁ, Pavlína; HRIČINOVÁ, Alena; TŮMA, Zdeněk; MORAVEC, Jiří; LYSÁK, Daniel; MATĚJOVIČ, Martin. Proteomic profiling of blood-dialyzer interactome reveals involvement of lectin complement pathway in hemodialysis-induced inflammatory response. *Proteomics Clin Appl*, 2010, 4, s. 829-838. **IF 2,956**
- VI. MAREŠ, Jan; THONGBOONKERD, Visith; TŮMA, Zdeněk; MORAVEC, Jiří; KARVUNIDIS, Thomas; MATĚJOVIČ, Martin. Proteomic analysis of proteins bound to adsorption units of extracorporeal liver support system under clinical conditions. *J Proteome Res*, 2009, 8, s. 1756-1764. **IF 4,245**

2.2.Původní přehledové práce

- VII. TŮMA, Zdeněk; KUNCOVÁ, Jitka; MAREŠ, Jan; GRUNDMANOVÁ, Martina; MATĚJOVIČ, Martin. Proteomic approaches to the study of renal mitochondria. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2016, doi: 10.5507/bp.2016.012. **IF 1,200**

2.3.Práce navazující na studovanou problematiku

- VIII. ČEDÍKOVÁ, Miroslava; MIKLÍKOVÁ, Michaela; STACHOVÁ, Lenka; GRUNDMANOVÁ, Martina; TŮMA, Zdeněk; VĚTVIČKA, Václav; ZECH, Nicolas; KRÁLÍČKOVÁ, Milena; KUNCOVÁ, Jitka. Effects of the Czech propolis on sperm mitochondrial function. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, s. 248768. **IF 1,880**
- IX. PAPAGIANNITSIS, Constantinos; KOTSAKIS, Stathis; TŮMA, Zdeněk; GNIADKOWSKI, Marek; MIRIAGOU, Vivi; HRABÁK, Jaroslav. Identification of CMY-2-Type Cephalosporinases in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58, s. 2952-2957. **IF 4,476**

3. LEGÁLNÍ A ETICKÉ ASPEKTY STUDIÍ

Všechny experimentální práce byly řádně schváleny etickou komisí při Lékařské fakultě UK v Plzni.

Protokoly klinických studií byly schváleny etickou komisí při FN v Plzni a Lékařské fakultě UK v Plzni a od všech pacientů zahrnutých do studií byl získán informovaný souhlas s účastí ve studiích.

4. CÍLE STUDIÍ

Mechanismy ve zdraví a nemoci pomocí proteomiky

- Vypracovat metodiku proteomické analýzy mitochondriálních proteinů pomocí kombinace centrifugační separace mitochondrií, dvojrozměrné gelové elektroforézy a hmotnostně spektrometrické identifikace proteinů. Použít proteomiku pro analýzu plazmy a tkáně u prasečích modelů sepse.

Klinické studie

- Izolovat proteiny adsorbované na umělé materiály a identifikovat proteiny specificky interagující s membránami mimotělních hemopurifikačních metod.

5. EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE

5.1. Analýza proteomu mitochondrií v ledvinách (studie I)

5.1.1. Design studie

Studie byla určena k analýze proteomu mitochondrií kůry a dřeně ledvin prasete. Pro analýzu byly použity ledviny z šesti zdravých prasat. Z každé ledviny byl vyříznut vzorek kůry a dřeně a pomocí diferenciální centrifugace byly připraveny příslušné mitochondriální frakce. Proteiny mitochondriálních frakcí byly separovány na dvojrozměrné elektroforéze (2-DE) a pomocí analýzy obrazů byly hledány proteinové skvrny, jejichž intenzita se lišila více než dvojnásobně mezi mitochondriální frakcí kůry a dřeně. Tyto skvrny byly vyříznuty z gelů, proteiny v nich obsažené byly identifikovány pomocí trypsinovému štěpení a hmotnostní spektrometrie. Pro detekci čistoty mitochondriálních frakcí a pro ověření proteomických výsledků byl použit Western blotting.

5.1.2. Výsledky a diskuse

Mitochondrie byly izolovány pomocí diferenciální centrifugace a pomocí western blottingu byla zjištěna přítomnost menšího množství proteinů cytosolu a jádra. Na elektroforetických gelech mitochondriálních frakcí bylo vybráno k identifikaci 81 proteinových skvrn s více než dvojnásobným rozdílem v intenzitě. Z nich pak 41 skvrn obsahovalo mitochondriální proteiny; ve zbylých byly identifikovány proteiny endoplazmatického retikula, cytoplazmy, peroxisomů a cytoskeletu. Pro validaci proteomických dat byla provedena analýza několika vybraných proteinů pomocí Western blottingu.

V mitochondriálních frakcích kůry ledvin byly větším množstvím detekovány enzymy zapojené v beta-oxidaci, metabolismu aminokyselin, a glukoneogenezi. Tyto procesy jsou charakteristické pro proximální tubulus a odpovídají velkému zastoupení mitochondrií v proximálním tubulu. Naše data se shodovala s dřívějšími pracemi, které uvádí beta oxidaci jako převažující zdroj energie pro procesy aktivního transportu v proximálním tubulu. Proximální tubulus je místem reabsorpce aminokyselin z primární moči. Aminokyseliny jsou využívány jako zdroj energie nebo v syntetických drahách. Glukoneogeneze v kůře ledvin využívá substráty (aminokyseliny a laktát) resorbované v proximálním tubulu.

Spektrum proteinů hojnějších v mitochondriálních frakcích dřeně ledvin zahrnovalo proteiny elektrontransportního systému (ETS), enzymy citrátového cyklu a mitochondriální poriny. V dřívějších studiích byla popsána zvýšená exprese pyruvátdehydrogenázy a zvýšená aktivita 2-oxoglutarátdehydrogenázy [59] a zvýšená exprese podjednotky 5B cytochrom c oxidázy v reakci na hypoxii [60]. Zvýšení exprese některých podjednotek ETS systému může souviset s adaptací mitochondrií dřeně na prostředí s nižší dostupností kyslíku.

Použití 2-DE pro studium mitochondrií může být limitováno horší detekcí hydrofobních proteinů. Rozdělení ledviny na kůru a dřeň představuje nejjednodušší způsob redukce komplexity. Pro detailnější popis populací mitochondrií v ledvinách by bylo nutné izolovat segmenty nefronu. Mitochondriální frakce obsahovaly proteiny z jiných subcelulárních organel, které mohly být izolovány spolu s mitochondriemi nebo asociovány s mitochondriální membránou [61]. Komplexy obsahující proteiny patřící do jiných subcelulárních organel jsou nacházeny v mitochondriích připravených pomocí centrifugace v hustotním gradientu [62] a mohou tedy být součástí mitochondriálního proteomu, ačkoliv jsou lokalizovány na jiné organele.

5.2. Proteom plazmy v časně fázi sepse (studie II)

5.2.1. Design studie

Ve studii byl zkoumán proteom plazmy při sepsi indukované peritonitidou na prasati. Experiment byl proveden na 7 prasatech, u kterých byla indukována seps. Během experimentu byla monitorována hemodynamika, výměna kyslíku, oxidativní a nitrosativní stres a další parametry. Vzorky plazmy pro proteomickou analýzu byly odebrány ve dvou časových bodech: před započítím sepse a 12 hodin po indukci sepse. Proteiny plazmy byly separovány na dvojrozměrné elektroforéze (2-DE). Bylo provedeno srovnání obrazů gelů za účelem nalezení proteinů, jejichž kvantita byla ovlivněna sepsí. Tyto proteiny byly identifikovány a bylo zjišťováno jejich zapojení v patofyziologických procesech.

5.2.2. Výsledky a diskuse

Proteiny plazmy byly nejprve separovány pomocí 2-DE v rozsahu hodnot izoelektrických bodů (pI) 3 až 10. Bylo zjištěno, že velká většina proteinů byla zobrazena v oblasti odpovídající pI 4 až 7. Pro dosažení lepšího rozlišení byly k analýze vzorků plazmy použity IPG stripky s rozsahem hodnot pI 4-7. Porovnáním obrazů gelů plazmy před započítím sepse a po 12 hodinách byly zjištěny změny relativních intenzit u 36 proteinových skvrn; ty byly vyříznuty z gelů a byla provedena identifikace. Celkem bylo identifikováno 22 proteinů ve 30 skvrnách se vzestupem intenzity a 5 proteinů v 6 skvrnách s poklesem intenzity způsobeném sepsí. Většina proteinů byla zapojena v odpovědi na zánět, a některé v oxidativním a nitrosativním stresu.

Význam některých proteinů lze dobře zasadit do kontextu současných poznatků o patofyziologii sepse. Protein CD14 je komponent vrozeného imunitního systému a funguje jako koreceptor při detekci bakteriálního lipopolysacharidu. Již dříve byl doložen vzrůst hladiny tohoto proteinu u pacienta se sepsí. Haptoglobin patří mezi proteiny akutní fáze a je zapojen v odpovědi na oxidativní stres jako scavenger radikálů. Také váže hemoglobin uvolněný z erytrocytů a tím inhibuje jeho oxidativní aktivitu. Hemopexin je další protein působící při oxidativním stresu jako protizánětlivá molekula a scavenger radikálů, který váže hem a transportuje jej do jater. Zvýšená hladina haptoglobinu byla také popsána v plazmě u pacientů v sepsi a zvýšená hladina hemopexinu v plazmě na myším modelu sepse. Je možné, že zvýšená hladina haptoglobinu při sepsi má ochranný efekt u pacientů majících zvýšenou hladinu volného hemoglobinu v plazmě [63].

Mezi limitace studie patří skutečnosti, že analýza byla provedena pouze v jednom časovém bodě po indukci sepse. Analýza vzorků odebíraných ve více časových bodech by mohla poskytnout detailnější informace o dynamice průběhu sepse. Použití plazmy pro proteomiku je také komplikováno omezeným dynamickým rozsahem detekce proteinů separovaných na 2DE, kdy dochází k zamaskování málo abundantních proteinů hojnými proteiny plazmy. Přesto studie poskytuje první literární analýzu proteomu plazmy u klinicky relevantního, velkého zvířecího modelu sepse.

5.3. Proteom tkáně ledvin v průběhu sepse (studie III)

5.3.1. Design studie

V této studii byl sledován proteom ledvin v průběhu sepse. Ve studii bylo použito 12 prasat, u kterých byla indukována sepse intravenózní infúzí živých bakterií a 5 zvířat v kontrolní skupině, která podstoupila pouze anestezii a operační zásah. Ve třech časových bodech (před počátkem sepse, po 12 hodinách a po 22 hodinách od indukce sepse) byly odebrány biopsie kůry ledvin. Proteiny byly extrahovány z biopsií a separovány pomocí 2D elektroforézy (2-DE). Byla provedena analýza obrazů gelů za účelem nalezení proteinů, jejichž exprese se měnila v důsledku sepse a proteinů, na jejichž expresi měla vliv anestezie s chirurgickým zásahem. Pro redukci počtu proměnných a pro usnadnění dalšího statistického zpracování byla nejprve použita explorativní analýza a pomocí t-testu hledány spoty, které se statisticky významně lišily mezi počátkem a některým z časových bodů experimentu. Tyto proteinové skvrny byly vybrány k identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF/TOF. Pro vyhodnocení multidimenzionálních dat bylo použito hierarchické shlukování. Rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA).

5.3.2. Výsledky a diskuse

Bližší pochopení složité patogeneze akutního poškození ledvin brání nedostupnost molekulárních analýz tkáně ledvin od pacientů. Perspektivní cestou je proto analýza dynamických změn renální proteomu na modelu, který má vysoký translační potenciál do klinické medicíny. Prase je považováno za dobrý modelový organismus pro genetickou a fyziologickou podobnost s člověkem [64].

Protože samotná operace a anestezie mohou ovlivnit proteom ledvin, je důležité nejdříve definovat vliv těchto intervencí na renální proteom. Jako kontrolní skupina byla proto použita v tomto experimentu zvířata, u kterých byl proveden pouze chirurgický inzult.

Analýza rozdílů v proteomech kontrolní skupiny ukázala změny oproti výchozímu bodu. Poté byly zkoumány rozdílů v proteomech septické skupiny. V kontrolní skupině bylo nalezeno 62 proteinových skvrn, které byly v nějakém bodě změněny oproti výchozímu stavu a v nich bylo identifikováno 11 proteinů, u septické skupiny pak 106 skvrn vykazujících změnu a obsahujících 29 proteinů. Na data bylo aplikováno hierarchické shlukování, pomocí něž byla data separována do clusterů odpovídajících kontrolní a septické skupině. To znamená, že chirurgický inzult sám o sobě způsobil detekovatelnou změnu proteomu, kterou lze odlišit od vlivu sepse.

Ve skupině změněných proteinů u kontrolní skupiny byly identifikovány proteiny fungující v drahách stresu endoplazmatického retikula a oxidativního stresu, mitochondriálního energetického metabolismu, tubulárního transportu a signalizace imunitní a zánětlivé odpovědi.

Pro nalezení proteinů, jejichž změna je vyvolaná pouze sepsí, byla použita analýza ANOVA. Jako vstupní data byly použity hodnoty skvrn, které se statisticky významně lišily mezi počátkem a některým z časových bodů experimentu. Bylo nalezeno 20 proteinových skvrn, jejichž intenzita byla změněna jen v septické skupině nebo vykazovala odlišné chování mezi septickou a kontrolní skupinou. Proteiny se změněnou expresí byly chaperony opravující proteiny, mitochondriální proteiny, proteiny zapojené v procesech stresu endoplazmatického retikula a oxidativním stresu.

Významnou částí proteinů podléhajících změnám u septické skupiny jsou mitochondriální proteiny. Zvýšené množství mitochondriální ATP-syntázy zjištěné naším experimentem je v protikladu s některými studiemi [65, 66] a může být chápáno jako argument proti selhávání

bioenergetiky v brzké fázi sepse. Protein NHE-RF3 (Na⁺/H⁺ exchange regulatory cofactor 3) je důležitý pro regulaci exprese a aktivity některých membránových receptorů a transportérů v renálních tubulech.

Použití biopsií namísto celé ledviny je výhodné pro sledování změn proteomu v několika časových bodech během sepse. Použití biopsií však může vnášet zkreslení. Ledvina je složena z několika druhů buněk a zastoupení různých typů buněk mezi biopsiemi může být variabilní. Poškození ledvin v průběhu AKI také není uniformní a v ledvině mohou existovat oblasti hypoxických nefronů vedle zdravých oblastí [67]. Detailnější analýza by vyžadovala separaci jednotlivých druhů buněk a využití citlivějších analytických technik (např. LC-MS). Přesto je práce první svého druhu, která ukazuje na rozsáhlý a dynamicky se chovající tkáňový proteom ledvin v průběhu sepse a přináší nové, hypotézu generující výsledky.

6. KLINICKÉ STUDIE

6.1. Interaktom systému pro náhradu funkce jater (studie IV)

6.1.1. Design studie

Cílem studie bylo vyvinout techniku pro analýzu proteinů zachycených v adsorpčních kolonách systému pro náhradu funkce jater (Prometheus, Fresenius Medical Care, DE). Systém Prometheus kombinuje frakcionovanou separaci plazmy a adsorpci (FPSA) s high-flux hemodialýzou [68]. Separovaná plazma je vedena přes kolonu obsahující vysoce porézní neutrálně nabitou pryskyřici s velkým vnitřním povrchem (Prometh1) a kolonu s aniontovou pryskyřicí (anexem) sloužící pro adsorpci toxinů z albuminu (Prometh2) [68].

Ve studii byly zkoumány proteiny adsorbované na kolony Prometh1 a Prometh2 po proceduře provedené u pacienta s akutním chronickým selháním jater. Před počátkem procedury byla odebrána plazma. Po ukončení procedury byly obě kolony vyprázdněny, promyty PBS pufrům a napuštěny roztokem dodecylsírany sodného (Prometh 1) a roztokem kyseliny octové (Prometh2). Proteiny eluované těmito roztoky byly separovány na 2DE. Pomocí analýzy obrazů byly zjištěny hodnoty izoelektrického bodu a molekulové hmotnosti, srovnány obrazy plazmy, eluátů, intenzity použity k hodnocení adsorpce. Vybrané skvrny proteinů byly vyříznuty z gelů a identifikovány.

6.1.2. Výsledky a diskuse

Pro studii byl přizpůsoben postup eluce proteinů z umělých povrchů [69]. Roztoky pro uvolnění proteinů z povrchů kolon byly vybírány s ohledem na charakter materiálu adsorpčních kolon. Pro neutrální kolonu Prometh1, kde jsme očekávali více hydrofobních proteinů, byl použit roztok SDS a pro kolonu Prometh2 s anexem byl použit kyseliny octové. Na polyakrylamidových 2DE gelech Prometh1 bylo detekováno 148 proteinových skvrn, na gelech Prometh2 pak 163 skvrn. Většina z nich se nacházela v oblasti pI 4,8-6,8 a hmotností 30-150 kDa.

Pro hodnocení adsorpce proteinů na materiál kolon byl použit poměr intenzity skvrn na gelech eluátů a plazmy (E/P). Na gelech Prometh1 byla hodnota E/P vyšší než 2,0 u 33 skvrn a nižší než 0,5 u 53 skvrn; na gelech Prometh2 pak mělo 32 skvrn hodnotu E/P vyšší než 2,0 a 71 hodnotu E/P nižší než 0,5. Z rozložení parametrů molekulové hmotnosti a izoelektrického bodu vyplývá, že proteiny s vyšší hmotností se adsorbovaly více na Prometh1 a proteiny s nižším pI výrazněji na Prometh2. Selektivní adsorpce proteinů by se částečně dala vysvětlit fyzikálními vlastnostmi proteinů a materiálu kolon. V eluátu kolony Prometh2 převládaly proteiny s nízkým izoelektrickým bodem, což odpovídá tomu, že kolona byla pokryta anexem. V eluátu z kolony Prometh1 se nacházely proteiny s vyšší molekulovou hmotností. Vysvětlení není úplně jasné, možná hrála roli větší afinita pryskyřice obsažené v Prometh1 k hydrofobním proteinům.

Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo identifikováno 72 skvrn z Prometh1, které obsahovaly 18 proteinů a 93 skvrn z Prometh2, které obsahovaly 30 proteinů. Proteiny s nejvyšším poměrem E/P a tedy nejintenzivnější adsorpcí byly transthyretin, trypsin-2, prothrombin, protein vázající hyaluronan (HAPB), a protein vázající retinol byly nalezeny na Prometh2. U některých proteinů bylo možné dohledat potenciální důsledky jejich eliminace. Transthyretin, který byl zjištěn jako hojně se adsorbující na Prometh2, váže v plazmě tyroxin a jeho hladina bývá snížena během dysfunkce jater. Protein vázající retinol vytváří komplex s bílkovinou transportujícím vitamin A, jeho snížená hodnota může být markerem malnutrice.

Protein vázající hyaluronan (HABP) byl nalezen jako výrazně se adsorbující na Prometh2. Tento protein je zapojen v kaskádě procesů přestavby jaterní tkáně při poškození jater. Při poškození jater byla pozorována přeměna prekursoru HABP na aktivní formu rozštěpením na lehký a těžký řetězec [70]. Bylo navrženo, že aktivovaný HABP může účinkovat v kaskádě přestavby tkáně následující po poškození jater. Na gelu Prometh2 byl HABP detekován ve skvrně odpovídající hmotnosti lehkého řetězce. V hmotnostním spektru pak byly nalezeny peptidy se sekvencí odpovídající tomuto lehkému řetězci.

6.2. Analýza interakce krve s kapilárami dialyzátorů (studie V)

6.2.1. Design studie

Cílem studie bylo vyvinout metodu získání proteinů adsorbovaných na membránu, provést proteomickou analýzu a hledat proteiny zapojené v procesu interakce krve s umělým povrchem kapilár dialyzátoru. Do studie bylo zahrnuto 5 pacientů léčených v dialyzačním středisku FN v Plzni (věk 58-82 let, doba jejich léčení dialýzou 5-42 měsíců). Od každého pacienty byly ze tří po sobě následujících procedur odebrány dialyzátory a plazma. Po ukončení hemodialýzy byl dialyzátor propláchnut roztokem Plasmalyte. Poté bylo do dialyzátoru napuštěno roztok ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA) ve fosfátovém pufru a recirkulován pomocí čerpadla. Roztok byl vypuštěn a do dialyzátoru byl napuštěn 40% roztok kyseliny octové a recirkulován pomocí čerpadla. Po recirkulaci byl roztok vypuštěn a použit k proteomické analýze. Po zakoncentrování a dialýze byly proteiny obsažené v plazmě, roztoku EDTA a roztoku kyseliny octové separovány pomocí 2-DE. Analýza obrazů gelů byla provedena za účelem porovnání zastoupení a relativní kvantity proteinů v těchto třech materiálech. Vybrané proteiny vykazující rozdíly v zastoupení byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF/TOF.

6.2.2. Výsledky a diskuse

Pro získání proteinů adsorbovaných na membrány byla použita metoda zahrnující sekvenci proplachů dialyzátoru. Nejprve byly odstraněny zbytky plazmy roztokem Plasmalyte. K odstranění adherovaných buněk byl pak aplikován roztok EDTA ve fosfátovém pufru [71] který je uváděn jako účinný v uvolnění adherovaných leukocytů. K uvolnění proteinů byl použit roztok kyseliny octové.

Koncentrace proteinů v EDTA proplachu a v kyselině octové byly vyšší než v roztoku Plasmalyte, kterým byl propláchnut dialyzátor na konci procedury. To znamenalo, že oba tyto roztoky uvolňují proteiny. Proto pro ověření kvality eluce proteinů byly analyzovány proteiny obsažené v EDTA proplachu, a srovnány s plazmou a eluátem v kyselině octové. Spoty detekované na gelech eluátu byly přítomné na EDTA proplachu a jejich intenzita se nelišila od plazmy. Tím bylo ověřeno, že v eluátu se nachází proteiny uvolněné z kapilár dialyzátoru.

Pro ověření efektivity elučního procesu byl na dvou dialyzátorech proveden pokus se sekvenční elucí roztokem SDS. První dialyzátor byl eluován postupně 40% kyselinou octovou následovanou 10% SDS, druhý dialyzátor stejnými roztoky v opačném pořadí. Množství proteinů získaných za použití pořadí kyselina octová-SDS byly 9,33 a 0,014 mg. Při opačném pořadí roztoků (SDS-kyselina octová) bylo získáno 6,99 a 2,85 mg proteinů. To dokazuje vhodnost použití roztoku kyseliny octové pro uvolnění maximálního množství proteinů z polysulfonové membrány. Výhoda kyseliny octové pro disociaci elektrostatických vazeb mezi

proteiny a membránou ve srovnání s jinými rozpouštědly může být teoreticky přičítána potlačení povrchové negativity polysulfonové membrány acetátovými ionty.

Elektroforéza byla provedena v rozsahu hodnot pI 3-10 a molekulových hmotností 10-200 kDa. Po provedené elektroforéze byly na obrazech gelů hledány proteiny, které vykazovaly adsorpci na stěny kapilár, jako kritérium byl použit poměr intenzit proteinové skvrny na gelu s proteiny eluátu a odpovídající skvrny na gelu s proteiny plazmy (E/P). Proteinové skvrny vyskytující se na gelech u všech pacientů (celkem 84) byly pak vybrány k identifikaci. Celkem bylo identifikováno 23 proteinů pocházejících z plazmy a erytrocytů.

Některé studie ukazují, že proteiny adsorbované na kapiláry nalezené v našem experimentu jsou zapojeny v interakci krve s umělým materiálem. Jsou to proteiny podílející se na aktivaci komplementu (komplement C3, ficolin-2, klusterin, MASP-1, MASP-2, komplement faktor H a komplement faktor H-related protein 1), proteiny zapojené v procesu srážení krve (fibrinogen, antitrombin a beta-2-glykoprotein-1), a protein zprostředkující adhezi a aktivaci leukocytů (amyloid P). Tyto proteiny vykazovaly vysokou hodnotu E/P, byly tedy ve velkém množství adsorbovány na povrch kapilár.

Srovnání hodnot izoelektrických bodů a molekulových hmotností odečtených z pozice skvrn na gelech s teoretickými hodnotami danými sekvencí proteinů ukázalo některé rozdíly. Ty by se daly vysvětlit komigrací abundantních proteinů (albuminu a hemoglobinu) a proteinů s podobnou molekulovou hmotností a izoelektrickým bodem. Nižší hmotnost u skvrn obsahujících komplement-3 a proteázy MASP1 a MASP2 odpovídala přítomnosti těchto proteinů jako aktivních forem vzniklých proteolytickým štěpením jejich prekurzorů. Ficolin-2 je protein z rodiny lektinů, tvoří komplexy s proteázami MASP 1 a 2. Po vazbě na buněčnou stěnu bakterií štěpí proteázy MASP a iniciuje lektinovou dráhu komplementu.

V rámci této studie byla vyvinuta a ověřena metoda eluce proteinů adsorbovaných na kapiláry dialyzátorů. Porovnání proteomu plazmy a adsorbovaných proteinů umožnilo nalezení proteinů specificky interagujících s materiálem kapilár. Výsledkem je nová hypotéza, že lektinová dráha přispívá k aktivaci komplementu při kontaktu krve s polysulfonovou membránou.

6.3. Proteomická analýza aktivace komplementu při kontaktu krve s kapilárami dialyzátorů (studie VI)

6.3.1. Design studie

Cílem studie bylo poskytnout vhled do procesů indukce zánětu a aktivace leukocytů a komplementu při hemodialýze. Do studie bylo zahrnuto 16 pacientů léčených v dialyzačním středisku Fakultní nemocnice v Plzni hemodialýzou s použitím polysulfonových dialyzátorů. Byly odebrány vzorky plazmy na začátku, po 15 minutách a po 4 hodinách od začátku hemodialýzy z proximálního i distálního portu (na vstupu a na výstupu z dialyzátoru). Po skončení hemodialýzy byly dialyzátory odpojeny a pro získání proteinů adsorbovaných na kapiláry byl použit protokol vyvinutý a publikovaný v předchozí práci (studie V). Plazma a eluát proteinů byly analyzovány pomocí 2DE a proteiny byly identifikovány pomocí štěpení v gelu a hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF/TOF. Koncentrace ficolinu, C5a a trombin/antitrombinu byly sledovány pomocí ELISA. Ve vzorcích plazmy byly stanoveny hladiny parametrů systémové biokompatibility (CD11b, CD14, CD15, CD62L, CD63 a CD66b).

6.3.2. Výsledky a diskuze

Eluáty proteinů byly analyzovány pomocí 2DE a na obrazech gelů bylo detekováno 217 proteinových skvrn, přičemž 164 skvrn bylo přítomno u alespoň 50% pacientů a 42 přítomno u každého pacienta. Obrazy gelů eluátu byly porovnány s obrazy gelů plazmy a u 112 z nich se intenzity významně lišily od odpovídajících skvrn v plazmě. Pro každý spot byl vypočten poměr intenzity v eluátu a plazmě (E/P) jako míra vazby daného proteinu na membránu kapilár. Pro redukci komplexity dat byla provedena analýza hlavních složek (PCA). Proteinové spoty byly podle dvou hlavních složek rozděleny do tří skupin. Proteiny byly dále identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Abundantní proteiny plazmy vykazovaly přibližně stejnou kvantitu na gelech plazmy a eluátu byly seskupeny v první skupině. V další skupině byly seskupeny intracelulární enzymy pocházející z lyzovaných erytrocytů zachycených v dialyzátoru. Třetí skupina proteinů byly proteiny plazmy s výrazně vyšší kvantitou na gelech eluátů. U těchto jsme předpokládali selektivní adsorpci díky specifické interakci s vnitřním povrchem kapilár. Tyto proteiny bylo možné zařadit do významných fyziologických procesů. Mezi nimi byly lektinová a alternativní dráha komplementu (ficolin 2, proteázy MASP, properdin), adheze buněk na substráty (tropomyosiny, aktiny, caldesmon, vinculin).

Pro další ověření identity proteinů bylo provedeno srovnání naměřené molekulové hmotnosti s teoretickou hodnotou. U proteinových skvrn obsahujících proteiny MASP-1, MASP-2 a komplement C3 bylo zjištěno, že se nachází na oblastí s menší molekulovou hmotností, než by odpovídalo teoretickým hodnotám. Detailním ověřením výsledků hmotnostní spektrometrie byla nalezena sekvence odpovídající jejich formám vzniklým proteolytickou aktivací.

Analýzou koncentrace v krvi na vstupu a na výstupu byla potvrzena ztráta ficolinu 2 a MASP-2 v průběhu dialýzy. Protože jsou tyto proteiny důležitými komponenty v imunitě, jejich ztráta může znamenat vyšší riziko infekce pro pacienta. Proteomická analýza tedy poskytla data pro potvrzení lektinové dráhy komplementu spuštěné vazbou ficolinu-2 na membránu kapilár dialyzátoru.

7. ZÁVĚRY

7.1. Experimentální studie

Analýza proteomu mitochondrií ledvin prasete ukázala rozdíly v mitochondriálních enzymech mezi kůrou a dřeně ledviny. Zastoupení enzymů v kůře ledviny odpovídá procesům odehrávajícím se v proximálním tubulu (beta oxidace, absorpce aminokyselin, glukoneogeneze), proteom mitochondrií dřeně nasvědčuje optimalizaci mitochondriálního metabolismu pro práci v prostředí s nízkou dostupností kyslíku.

Analýza proteomu plazmy při sepsi indukované peritonitidou byla provedena pomocí dvojrozměrné gelové elektroforézy. Ačkoliv dvojrozměrná gelová elektroforéza poskytuje jen limitovanou informaci o proteomu plazmy, byly identifikovány některé proteiny související s detekcí bakteriálního lipopolysacharidu, s oxidativním stresem a proteiny vázající volný hem.

Proteom biopsií ledvin prasat s indukovanou sepsí poskytl informaci o změnách v průběhu časné fáze sepse. Použití biopsií ze dvou časových okamžiků ukázalo dynamické změny některých proteinů. Zařazením skupiny operovaných prasat jako kontroly byl ukázán vliv chirurgického zásahu na proteom ledvin. Proteiny se změněnou expresí u septických prasat byly chaperony opravující proteiny, proteiny mitochondrií, proteiny zapojené v procesech stresu endoplazmatického retikula a oxidativním stresem.

7.2. Klinické studie

Byly popsány proteiny, které interagují s materiály adsorpčních kolon systému Prometheus. Materiály kolon vykazovaly rozdílnou afinitu k proteinům. Některé proteiny spojené s dysfunkcí jater se hojně adsorbovaly na materiál kolon, což může být významné pro zdravotní stav pacientů podstupujících léčbu.

Byla připravena metoda pro získávání proteinů z povrchů kapilár hemodialyzátorů a použita pro izolaci proteinů adsorbovaných na polysulfonových kapilárách. Mezi proteiny reagujícími s polysulfonovým povrchem byly proteiny podílející se na aktivaci komplementu, adhezi a aktivaci leukocytů a srážení krve.

Tato metoda byla dále použita při zkoumání procesů indukce zánětu a aktivace leukocytů a komplementu při hemodialýze. Bylo potvrzeno, že adsorpce ficolinu-2 je spouštěčem lektinové dráhy aktivace komplementu a vede k leukopenii. Ficolin-2 je důležitou složkou komplementu a jeho odstraňování při dialýze může vést ke snížení imunity pacientů. Tyto postupy a výsledky je možné použít pro další studium biokompatibility dialyzátorů.

8. LITERATURA

1. Wang, X., et al., *Better understanding of organ dysfunction requires proteomic involvement*. J Proteome Res, 2006. **5**(5): 1060-2.
2. Bohra, R., et al., *Proteomics and metabolomics in renal transplantation-quo vadis?* Transpl Int, 2013. **26**(3): 225-41.
3. Karas, M., et al., *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem, 1988. **60**(20): 2299-301.
4. Yamashita, M., et al., *Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme*. Journal of Physical Chemistry, 1984. **88**(20): 4451-4459.
5. Liebler, D.C., et al., *Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry*. Biochemistry, 2013. **52**(22): 3797-806.
6. Cesnik, A.J., et al., *Human Proteomic Variation Revealed by Combining RNA-Seq Proteogenomics and Global Post-Translational Modification (G-PTM) Search Strategy*. J Proteome Res, 2016. **15**(3): 800-8.
7. Klawitter, J., et al., *A metabolomic and proteomic analysis of changes in IMCD3 cells chronically adapted to hypertonicity*. Nephron Physiol, 2008. **109**(1): p1-10.
8. Amado, F.M., et al., *One decade of salivary proteomics: current approaches and outstanding challenges*. Clin Biochem, 2013. **46**(6): 506-17.
9. Kroksveen, A.C., et al., *Proteomics of human cerebrospinal fluid: discovery and verification of biomarker candidates in neurodegenerative diseases using quantitative proteomics*. J Proteomics, 2011. **74**(4): 371-88.
10. Thongboonkerd, V., et al., *Systematic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics: quantity, quality, and variability*. J Proteome Res, 2006. **5**(1): 183-91.
11. Tuck, M.K., et al., *Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group*. J Proteome Res, 2009. **8**(1): 113-7.
12. Lundblad, R.L., *Considerations for the Use of Blood Plasma and Serum for Proteomic Analysis*. The Internet Journal of Genomics and Proteomics, 2003. **1**(2).
13. Dayon, L., et al., *Proteomics of human plasma: A critical comparison of analytical workflows in terms of effort, throughput and outcome*. EuPA Open Proteomics, 2013. **1**: 8-16.
14. Rodriguez-Suarez, E., et al., *Urine as a source for clinical proteome analysis: from discovery to clinical application*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1844**(5): 884-98.
15. Kushnir, M.M., et al., *A depletion strategy for improved detection of human proteins from urine*. J Biomol Tech, 2009. **20**(2): 101-8.
16. Nagaraj, N., et al., *Quantitative analysis of the intra- and inter-individual variability of the normal urinary proteome*. J Proteome Res, 2011. **10**(2): 637-45.
17. Coon, J.J., et al., *CE-MS analysis of the human urinary proteome for biomarker discovery and disease diagnostics*. Proteomics Clin Appl, 2008. **2**(7-8): 964-973.
18. Walden, M., et al., *Proteomics of Human Dialysate and Ultrafiltrate Fluids Yielded by Renal Replacement Therapy*, in *Proteomics of Human Body Fluids: Principles, Methods, and Applications*, V. Thongboonkerd, Editor. 2007, Humana Press Inc.: Totowa, NJ. p. 509-520.
19. Guo, T., et al., *Rapid mass spectrometric conversion of tissue biopsy samples into permanent quantitative digital proteome maps*. Nat Med, 2015. **21**(4): 407-13.
20. Shaw, M.M., et al., *Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis*. Proteomics, 2003. **3**(8): 1408-17.
21. Rabilloud, T., *Membrane proteins and proteomics: love is possible, but so difficult*. Electrophoresis, 2009. **30 Suppl 1**: S174-80.
22. Wisniewski, J.R., et al., *Universal sample preparation method for proteome analysis*. Nat Methods, 2009. **6**(5): 359-62.

23. Feist, P., et al., *Proteomic challenges: sample preparation techniques for microgram-quantity protein analysis from biological samples*. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(2): 3537-63.
24. Andreyev, A.Y., et al., *Application of proteomic marker ensembles to subcellular organelle identification*. *Mol Cell Proteomics*, 2010. **9**(2): 388-402.
25. Graham, J.M., *Purification of a crude mitochondrial fraction by density-gradient centrifugation*. *Curr Protoc Cell Biol*, 2001. **Chapter 3**: Unit 3 4.
26. Jiang, Y., et al., *Comparative mitochondrial proteomics: perspective in human diseases*. *J Hematol Oncol*, 2012. **5**: 11.
27. Kikuchi, M., et al., *Proteomic analysis of rat liver peroxisome: presence of peroxisome-specific isozyme of Lon protease*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(1): 421-8.
28. Korfali, N., et al., *The nuclear envelope proteome differs notably between tissues*. *Nucleus*, 2012. **3**(6): 552-64.
29. Peng, F., et al., *Proteomic and bioinformatics analyses of mouse liver microsomes*. *Int J Proteomics*, 2012. **2012**: 832569.
30. Raturi, A., et al., *Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM)*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1833**(1): 213-24.
31. Rabilloud, T., et al., *Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future*. *J Proteomics*, 2010. **73**(11): 2064-77.
32. O'Connell, K., et al., *Proteomic DIGE analysis of the mitochondria-enriched fraction from aged rat skeletal muscle*. *Proteomics*, 2009. **9**(24): 5509-24.
33. Wittig, I., et al., *Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis*. *Proteomics*, 2008. **8**(19): 3974-90.
34. Shevchenko, A., et al., *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(6): 2856-60.
35. Aebersold, R., et al., *Mass spectrometry in proteomics*. *Chem Rev*, 2001. **101**(2): 269-95.
36. Bateman, N.W., et al., *Maximizing peptide identification events in proteomic workflows using data-dependent acquisition (DDA)*. *Mol Cell Proteomics*, 2014. **13**(1): 329-38.
37. Zhang, X., et al., *Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics--a review*. *Anal Chim Acta*, 2010. **664**(2): 101-13.
38. Sutandy, F.X., et al., *Overview of protein microarrays*. *Curr Protoc Protein Sci*, 2013. **Chapter 27**: Unit 27 1.
39. Ramachandran, N., et al., *Applications of protein microarrays for biomarker discovery*. *Proteomics Clin Appl*, 2008. **2**(10-11): 1444-59.
40. Muthu, M., et al., *Tracing the voyage of SELDI-TOF MS in cancer biomarker discovery and its current depreciation trend – need for resurrection?* *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016. **76**: 95-101.
41. Cottrell, J.S., *Protein identification using MS/MS data*. *J Proteomics*, 2011. **74**(10): 1842-51.
42. Michalski, A., et al., *More than 100,000 detectable peptide species elute in single shotgun proteomics runs but the majority is inaccessible to data-dependent LC-MS/MS*. *J Proteome Res*, 2011. **10**(4): 1785-93.
43. Zhou, Y., et al., *Recent advances in stable isotope labeling based techniques for proteome relative quantification*. *J Chromatogr A*, 2014. **1365**: 1-11.
44. Bantscheff, M., et al., *Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review*. *Anal Bioanal Chem*, 2007. **389**(4): 1017-31.
45. Wu, C.C., et al., *Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems*. *Curr Opin Mol Ther*, 2002. **4**(3): 242-50.
46. Liu, Y., et al., *Mass spectrometric protein maps for biomarker discovery and clinical research*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2013. **13**(8): 811-25.
47. Lange, V., et al., *Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial*. *Mol Syst Biol*, 2008. **4**: 222.
48. Bugger, H., et al., *Tissue-specific remodeling of the mitochondrial proteome in type 1 diabetic akita mice*. *Diabetes*, 2009. **58**(9): 1986-97.

49. Husi, H., et al., *A combinatorial approach of Proteomics and Systems Biology in unravelling the mechanisms of acute kidney injury (AKI): involvement of NMDA receptor GRIN1 in murine AKI*. BMC Syst Biol, 2013. **7**: 110.
50. Go, Y.M., et al., *Integrated redox proteomics and metabolomics of mitochondria to identify mechanisms of cd toxicity*. Toxicol Sci, 2014. **139**(1): 59-73.
51. Del Boccio, P., et al., *Integration of metabolomics and proteomics in multiple sclerosis: From biomarkers discovery to personalized medicine*. Proteomics Clin Appl, 2016. **10**(4): 470-84.
52. Zhang, Z., et al., *The road from discovery to clinical diagnostics: lessons learned from the first FDA-cleared in vitro diagnostic multivariate index assay of proteomic biomarkers*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(12): 2995-9.
53. Heegaard, N.H., et al., *Important options available--from start to finish--for translating proteomics results to clinical chemistry*. Proteomics Clin Appl, 2015. **9**(1-2): 235-52.
54. Addona, T.A., et al., *A pipeline that integrates the discovery and verification of plasma protein biomarkers reveals candidate markers for cardiovascular disease*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(7): 635-43.
55. Colvin, K.L., et al., *Proteomics of pulmonary hypertension: could personalized profiles lead to personalized medicine?* Proteomics Clin Appl, 2015. **9**(1-2): 111-20.
56. Shao, S., et al., *Mass spectrometry-based proteomic quest for diabetes biomarkers*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1854**(6): 519-27.
57. Schanstra, J.P., et al., *Proteomic urinary biomarker approach in renal disease: from discovery to implementation*. Pediatr Nephrol, 2015. **30**(5): 713-25.
58. Sallam, R.M., *Proteomics in cancer biomarkers discovery: challenges and applications*. Dis Markers, 2015. **2015**: 321370.
59. Dukhande, V.V., et al., *Chronic hypoxia-induced alterations of key enzymes of glucose oxidative metabolism in developing mouse liver are mTOR dependent*. Mol Cell Biochem, 2011. **357**(1-2): 189-97.
60. Trueblood, C.E., et al., *Differential regulation of the two genes encoding Saccharomyces cerevisiae cytochrome c oxidase subunit V by heme and the HAP2 and REO1 genes*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(10): 4537-40.
61. Lebedzinska, M., et al., *Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and other subcellular organelles*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(10): 1805-16.
62. Reifschneider, N.H., et al., *Defining the mitochondrial proteomes from five rat organs in a physiologically significant context using 2D blue-native/SDS-PAGE*. J Proteome Res, 2006. **5**(5): 1117-32.
63. Janz, D.R., et al., *Association between haptoglobin, hemopexin and mortality in adults with sepsis*. Crit Care, 2013. **17**(6): R272.
64. Bendixen, E., *Animal models for translational proteomics*. Proteomics Clin Appl, 2014. **8**(9-10): 637-9.
65. May, C.N., et al., *Renal bioenergetics during early gram-negative mammalian sepsis and angiotensin II infusion*. Intensive Care Med, 2012. **38**(5): 886-93.
66. Porta, F., et al., *Effects of prolonged endotoxemia on liver, skeletal muscle and kidney mitochondrial function*. Crit Care, 2006. **10**(4): R118.
67. Matejovic, M., et al., *Renal Hemodynamics in AKI: In Search of New Treatment Targets*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(1): 49-58.
68. Santoro, A., et al., *Prometheus system: a technological support in liver failure*. Transplant Proc, 2006. **38**(4): 1078-82.
69. Ishikawa, I., et al., *Proteomic analysis of serum, outflow dialysate and adsorbed protein onto dialysis membranes (polysulfone and pmma) during hemodialysis treatment using SELDI-TOF-MS*. Am J Nephrol, 2006. **26**(4): 372-80.
70. Choi-Miura, N.H., et al., *Hepatic injury-specific conversion of mouse plasma hyaluronan binding protein to the active hetero-dimer form*. Biol Pharm Bull, 2001. **24**(8): 892-6.

71. Grooteman, M.P., et al., *Ex vivo elution of hemodialyzers. An additional criterion for the assessment of bioincompatibility.* Blood Purif, 1996. **14**(6): 421-30.

