

Proteomika w uronefropologii – nowe perspektywy diagnostyki nieinwazyjnej?

W związku z podejmowanymi szeroko międzynarodowymi inicjatywami badawczymi w zakresie proteomiki nerek i moczu (kidney and urine proteomics), proteom moczu, tj. skład jakościowy i ilościowy wszystkich białek znajdujących się w moczu, jest intensywnie badany nie tylko z punktu widzenia chorób nerek i dróg moczowych. 'Proteomika', dział nauki analizującej proteom, koncentruje się na możliwościach jednoczesnej analizy setek do tysięcy białek obecnych w próbce. Rozwój technik proteomicznych stwarza zupełnie nowe możliwości detekcji białek pod kątem zastosowań diagnostycznych, wnosząc pełniejszą informację niż analiza pojedynczych markerów białkowych. Techniki proteomiczne oparte na spektrometrii mas (MS) dzięki wysokiej przepustowości, mają szansę na szersze wykorzystanie w rutynowej diagnostyce przesiewowej. Koncepcja analizy białek za pomocą technik MS jest taka sama bez względu na właściwości biochemiczne i znaczenie fizjologiczne analizowanych cząsteczek, które identyfikowane są na podstawie ich mas cząsteczkowych. Określenie korelacji jakościowych i ilościowych w obrębie wielobiałkowych paneli markerów z materiału pobieranego bezinwazyjnie z diagnozowaną jednostką chorobową, stwarza podstawy do opracowania „ciekłej biopsji” – alternatywy diagnostycznej do procedury inwazyjnej obciążającej wieloma powikłaniami. Wieloskładnikowy białkowy „odcisk palca” charakteryzuje się większą specyficnością w stosunku do pojedynczych nieskorelowanych markerów. Odpowiednia analiza statystyczna, metody klasyfikacji danych proteomicznych w celu doboru dyskryminatora o wartości diagnostycznej, tj. wysokiej czułości i specyficności, w dalszym ciągu pozostają problemem do rozwiązania. W związku z potencjałem diagnostycznym rozwijających się metod proteomicznych, także w uronefropologii, techniki te zasługują na przybliżenie dostępnym językiem. Przystępny opis hermetycznych zagadnień oraz tła medycznego z drugiej strony, umożliwi lepsze zrozumienie i współpracę interdyscyplinarną w zakresie przyszłych zastosowań technik proteomicznych w diagnostyce medycznej.

(NEFROL. DIAL. POL. 2009, 13, 15-21)

Proteomics in uronephrology – new perspectives of noninvasive diagnostics?

Recently, according to many wide initiatives on the kidney and urine proteomics, the urine proteome, e.g. qualitative and quantitative content of proteinuria, is intensively analyzed, not only from the viewpoint of kidney and urinary tract diseases. Proteomics, the science branch exploring proteome, concentrates on simultaneous analysis of hundreds up to thousands proteins in the sample. Recent developments of proteomic techniques bring new tools for protein identification with potential application in medical diagnostics, contributing significantly wider information than single protein marker analysis. Due to high throughput, proteomic techniques based on mass spectrometry (MS) hold the promise of wider routine diagnostic applications. The simple physical rationale is employed in those methodologies, no matter what biochemical properties and physiological meaning molecules possess – ionized peptides are detected on the basis of their molecular masses. The search for correlations of multiple protein markers panel from non invasively collected sample with a diagnosed disease, makes possible the "fluid biopsy" as an alternative to invasive procedures biased by many complications. Such a 'protein fingerprint' of the disease could provide more specific diagnostic tool than uncorrelated markers on its own. The issue of statistical analysis and classification methods of proteomics data to provide disease discriminator of diagnostic value, efficient sensitivity and specificity, however, still remains a puzzle to be solved. According to diagnostic potential in uronephrology, proteomic techniques deserve for clarification in layman terms. The simple explanation of hermetic terminology and medical background on the other side is essential for better understanding, interdisciplinary cooperation and development in the clinical diagnostics field.

(NEPHROL. DIAL. POL. 2009, 13, 15-21)

Andrzej LEWANDOWICZ^{1*}

Magdalena BAKUN²

Jacek IMIELA¹

Michał DADLEZ²

¹I Oddział Wewnętrzny i Nefrologii
Międzyleski Szpital Specjalistyczny
Ordynator Oddziału: Dr hab. med. Jacek Imiela

²Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Środowiskowe Laboratorium Spektrometrii Mas
Warszawa

Słowa kluczowe:

- proteomika moczu
- spektrometria mas
- proteom
- ciekła biopsja

Key words:

- urine proteomics
- mass spectrometry
- proteome
- fluid biopsy

Adres do korespondencji:
Dr hab. lek. med. Andrzej Lewandowicz
I Oddział Wewnętrzny i Nefrologii
Międzyleski Szpital Specjalistyczny
Tel. 47-35-311; Fax. 47-35-311
e-mail: alewandow@gmail.com

Wstęp

Analiza peptydów i białek o znaczeniu markerowym w płynach fizjologicznych należy do kluczowych metod wspierających diagnostykę kliniczną. Coraz bardziej istotne miejsce zajmuje analiza białek moczu, a to z racji rozwoju technik umożliwiających jednoczesną detekcję ogromnej ilości peptydów i białek w pojedynczej próbce. Mocz jest materiałem przydatnym do diagnostyki chorób wywodzących się nie tylko z układu moczowego. Test „pienienia moczu” (ang. *foam test*) stosowany był do wykrywania białka od wielu wieków, a historycznie znacząca analiza białek moczu sięga XIX w., kiedy to w 1848 r. *Henry Bencke-Jones* wykazał obecność lekkich łańcuchów immunoglobulin, tj. białka *Bencke-Jonesa* [23]. Jego oznaczenie w moczu jest czułym wskaźnikiem dyskrazji klonalnych, w tym szpiczaka mnogiego [42,29].

Patofizjologia i diagnostyka białkomoczu

Układ filtracyjny nerek stanowi kluczową barierę fizjologiczną chroniącą przed utratą białek filtrowanej krwi, umożliwiając zachowanie bilansu białkowego. Z racji mechanizmów filtracji i reabsorpcji, mocz jest materiałem mniej złożonym od surowicy, choć nadal zawiera wiele składników białkowych i peptydowych. Białka niskocząsteczkowe o ładunku dodatnim swobodnie przesączane w warunkach fizjologicznych przez kłębuszki nerkowe, są następnie reabsorbowane i endocytowane w kanalikach bliższych pętli nefronu z udziałem układu megaliny i kubiliny [10]. Wydalana z moczem niewielka ilość białek wchodzi w skład fizjologicznego białkomoczu, nieprzekraczającego przyjmowanej arbitralnie wartości 150 mg/dobę [16]. M.in. mukoproteiny (białko *Tamm-Horsfalla*, tj. uromodulina) [8], białka grupy krwi, śladowe ilości hormonów i enzymów, oraz albuminy w ilości rzędu 10 mg/dobę to powszechnie znane składniki zdrowego moczu. Mikroalbuminuria rzędu 30-300 mg/dobę (tj. ok. 30-300 mg/g kreatyniny [51]) uważana jest za stan patologiczny, czynnik uszkadzający strukturę kłębuszka oraz negatywny czynnik prognostyczny chorób układu sercowo-naczyniowego [21]. Obniżenie białkomoczu stanowi cel terapii chorób objawiających się zespołem nercycowym. Patologiczne zwiększenie białkomoczu przednerkowego może wynikać m.in. z efektu przeładowania w sytuacji nadmiaru syntezy białek produkowanych w organizmie, przekraczającej zdolność wtórnego wchłaniania bliższych kanalików nerkowych (np. dyskrazje klonalne z wytwarzaniem nadmiernych ilości łańcuchów immunoglobulin).

Białkomocz najczęściej jest efektem uszkodzenia struktury i upośledzenia funkcji kłębuszków nerkowych w pierwotnych i wtórnych kłębuszkowych chorobach nerek. Prowadzą one do zwiększenia przepuszczalności bariery filtracyjnej kłębuszków względem białek wysokocząsteczkowych. Z drugiej strony, upośledzenie funkcji cewek nerkowych bliższych w cewkowo-śródmiaższowych chorobach nerek, w tym zmianach spowodowanych niedokrwieniem lub toksycznym uszkodzeniem, skutkuje ograni-

eniem zdolności reabsorpcji także dla fizjologicznej ilości protein pojawiających się w moczu pierwotnym [3]. Aktywna sekrecja przez komórki śródbłonka, podocyty kłębuszków, śródbłonek kanalików nerkowych oraz nabłonek innych pętli dróg moczowych, które wydzielają białka egzosomalne w ilości i składzie determinowanym przez proces chorobowy (ok. 3% całkowitej zawartości białkomoczu), to pozafiltrycyjne źródło białek moczu [39]. Mimo bariery kłębuszków dla wysokocząsteczkowych, ujemnie naładowanych białek oraz aktywnych procesów resorpcji protein w kanalikach bliższych, liczbę peptydów i białek obecnych w moczu fizjologicznym ocenia się na około od 250 do 1400 [37]. Wzrost czułości metod analitycznych, nie odnosząc się tu do możliwości rutynowych zastosowań diagnostycznych białek występujących w niezwykle niskim stężeniu, prowadzi do wzrostu szacunków tej liczby [52,38].

Zaburzenia struktury i funkcji nefronu determinują skład białkomoczu

Nie bez podstawy można oczekiwać, że zmiany patofizjologiczne mikroskopowej struktury nefronu uwidaczniane w preparatach biopsyjnych metodami immunologicznymi i histochemicznymi powinny przekładać się na profil ilościowy i jakościowy białkomoczu warunkowany upośledzoną funkcją nerek. Znanych jest wiele chorobowych markerów białkowych wydalanych z moczem, a perspektywy ich zastosowań nie ograniczają się do chorób nerek i układu moczowego [5,36,40,50]. Pojedyncze markery charakteryzują się z reguły niską czułością i specyficznością, a ich wartość diagnostyczna nie może stanowić pewnego kryterium rozpoznania i klasyfikacji choroby. Idealem diagnostycznym są tzw. markery 'zero-jedynkowe', o dużym stosunku wartości odcięcia do normy. Kryteria te w pewnym zakresie spełniają markery ostrego toksycznego uszkodzenia nerek, np. ektodomena białka transbłonowego human Kidney Injury Molecule-1 (hKIM-1) niewykrywalna w moczu zdrowym, interleukina-18, NAG (N-acetyl-beta-d-glucosaminidase) czy też NGAL (neutrophil gelatinase associated lipocalin), białka którego sekrecja w moczu podczas ostrego uszkodzenia nerek wzrasta o ok. dwa rzędy wielkości bardziej w stosunku do wzrostu w surowicy [7,12,33]. Ze zrozumiałych względów markery przewlekłych stanów chorobowych o podłożu zapalnym mogą być mniej czułe i mniej swoiste.

Alternatywą dla diagnostyki opartej na oznaczeniu pojedynczych markerów jest analiza wieloelementowych paneli markerów białkowych i peptydowych – tj. zestawów wybranych białek tworzących specyficzny „odcisk palca” choroby, określony wzór (ang. *pattern*) ekspresji lub sekrecji, uwzględniający stosunki jakościowe i ilościowe peptydów i białek produkowanych w określonych warunkach patofizjologicznych.

Idea panelu markerów wywodzi się z analogicznego podejścia zaczerpniętego z kliniki – o ile pojedynczy marker podobnie jak wyizolowany objaw, poza szczególnymi przypadkami nie może prowadzić do rozpoznania, o tyle korelacja szerokiego zestawu markerów przybiera znaczenie diagnostycz-

ne, podobnie jak rozpoznanie, oparte na analizie przez lekarza klinicystę wielu objawów i danych klinicznych analizowanych we wspólnym kontekście.

Proteomika – kompleksowe podejście do markerów chorobowych

Analiza wieloskładnikowych paneli białkowych możliwa jest dzięki rozwijającym się technikom proteomicznym, które umożliwiają szybką, jednoczesną detekcję obecności setek do tysięcy białek i peptydów w badanym materiale. Proteomika stanowi dział wiedzy zajmujący się wykrywaniem i charakterystyką białek i ich oddziaływań, wytwarzanych przez określone struktury organizmu, tkanki lub pojedyncze komórki. „Proteom” to zestaw białek wydzielanych przez określony organ, tkankę lub pojedyncze komórki lub skład białek obecny w określonym płynie fizjologicznym. Proteomika jest dziedziną uzupełniającą genomikę, która określa i interpretuje sekwencję genomu. Podejście proteomiczne cechuje się pewną przewagą nad genomiką, która umożliwia określenie jedynie obrazu statycznego, tj. sekwencji genów potencjalnie podlegających ekspresji. Genomika funkcjonalna oparta na analizie mRNA również nie oddaje pełnego obrazu ekspresji białek. Choroba jako proces dynamiczny modyfikuje włączanie i wyłączenie ekspresji określonych genów, co skutkuje zmianą stosunków jakościowych wśród produkowanych i wydzielanych białek. Wykorzystanie proteomiki w diagnostyce możliwe jest jedynie dzięki rozwojowi technik bioinformatycznych umożliwiających analizę i klasyfikację ogromnych ilości danych o skomplikowanej strukturze [26].

Metody przedproteomiczne w diagnostyce klinicznej

Elektroforeza jednokierunkowa w połączeniu z detekcją immunoenzymatyczną to metody szeroko stosowane w diagnostyce medycznej, jednak ograniczone pod względem liczby wykrywanych białek ze względu na niską rozdzielczość. Bardziej efektywna elektroforeza dwukierunkowa o wysokiej rozdzielczości rzędu 1000 rozpoznawanych białek, mimo niewątpliwych zalet, w tym jako metody wykorzystywanej do wstępnego rozdziału [25], nie nadaje się do szerszego wdrożenia diagnostycznego z powodu czasochłonności oraz niskiej powtarzalności wyników zależnej od warunków przygotowania żelu oraz próbek. Modyfikacja DIGE (*2D Differential in Gel Electrophoresis*) umożliwia dokładne i dobrze odtwarzalne różnicowanie profilu znakowanych barwnikami białek obecnych w próbce badanej i kontrolnej w tym samym żelu, jednak ze względu na koszty i czasochłonność, technika ta ogranicza swoje zastosowania do badań naukowych [53].

Metody proteomiczne – podejście celowane vs. nieukierunkowane

Warsztat technik proteomicznych wykorzystuje m.in. mikromacierze białkowe (ang. *biochip*, *proteinchip*) oraz powszechnie stosowane techniki spektrometrii mas (*mass spectrometry*, MS) [13]. Macierze białkowe konstruowane są pod kątem wykrywania określonych białek docelowych (ang. *protein targets*). Otrzymuje się je najczęściej

poprzez zakotwiczenie na matrycy specyficznych przeciwciał monoklonalnych, a więc technika ta jest ograniczona do oznaczania białek znanych a priori [54].

Spektrometria mas (MS) nie ogranicza się tylko do białek z góry określonych. Analiza białek za pomocą technik MS odbywa się według tej samej zasady fizykochemicznej, bez względu na ich właściwości biochemiczne. Cząsteczki białek identyfikowane są w oparciu o masy jonów powstałych w wyniku ich jonizacji, podobnie jak automat przyjmujący monety o określonym nominale identyfikuje je po masie lub średnicy. Doniesienia o zastosowaniu techniki MS w diagnostyce medycznej sięgają już lat 50-tych [4, 15]. Techniki spektrometrii mas są coraz częściej wykorzystywane w przesiewowej diagnostyce klinicznej, obecnie głównie w metabolomice, tj. analizie metabolitów obecnych w płynach ustrojowych, m.in. pod kątem wrodzonych zaburzeń metabolicznych [47].

Najczęściej spotykana terminologia i metody MS

O ile schemat działania spektrometrów mas jest taki sam (jonizacja cząsteczki, selekcja naładowanych cząsteczek oraz ich detekcja) to droga do uzyskania zamierzonego efektu (pomiar masy cząsteczki i jej identyfikacja) bywa różna w zależności od ich konstrukcji.

Metody jonizacji najczęściej stosowane w proteomice to: ESI (ang. *Electrospray Ionisation*) – elektrorozpylanie polegające na rozpylaniu roztworu zawierającego badane białko za pomocą igły, do której przyłożone zostało wysokie napięcie; MALDI (ang. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) – desorpcja laserowa z udziałem matrycy – kolejna metoda łagodnej jonizacji niepowodująca fragmentacji cząsteczek, a jedynie ich jonizację dzięki przekazanej energii z matrycy wzbudzonej wiązką lasera. Stosowane są także różne analizatory, tj. TOF (ang. *Time of Flight*) – analizator czasu przelotu, w którym masa jonu określana jest na podstawie czasu dotarcia do detektora; analizator kwadrupolowy (ang. *Quadrupole*) – działający jako filtr masy, przepuszczający w danej chwili tylko jony o określonym stosunku masy do ładunku (m/z); LTQ (ang. *Linear Ion Trap*) – liniowa pułapka jonowa lub FTICR (ang. *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) – analizator cyklotronowego rezonansu jonów z fourierowską transformacją wyników (por. tabela 1).

Przed etapem jonizacji i pomiarem masy jonów, konieczny jest z reguły wstępny rozdział próbki, szczególnie w przypadku gdy mamy do czynienia ze złożonym materiałem biologicznym jak mocz, surowica lub osocze. Rozdziału tego dokonuje się najczęściej za pomocą połączonego w jednym układzie ze spektrometrem mas systemem do wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (ang. *High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC) w wersji nano-kolumnowej (ang. *nano-Liquid Chromatography*, nano-LC), lub systemem do elektroforezy kapilarnej (ang. *Capillary Electrophoresis*, CE). Rozdział chromatograficzny poprzedzony może być dodatkowo (*off line*) procesem tzw. izoelektroogniskowania (IEF ang. *Isoelectrophocusing*). Polega on na rozdziale

peptydów w oparciu o ich punkty izoelektryczne. Metod wstępnej separacji jest jednak bardzo wiele.

Ze względu na odwrotną zależność czułości pomiaru od masy cząsteczki, mieszaniny białek trawione są wstępnie za pomocą specyficznej proteazy, zazwyczaj trypsyny. I to właśnie mieszanina „peptydów tryptycznych” (ang. *tryptic peptides*) poddawana jest wstępnemu rozdziałowi, a następnie analizowana w spektrometrze mas. Warto nadmienić, że zestaw mas peptydów tryptycznych, kierowanych do spektrometru, pewniej identyfikuje wyjściowe białko niż masa całego białka. Jest to jednym z dwóch powodów, dla których analizowane białka poddaje się wstępnemu trawieniu. Drugim z nich jest wyższa czułość technik MS dla niskocząsteczkowych peptydów, tj. produktów trawienia otrzymanych z wyjściowych białek.

Pomiar masy jonu z dokładnością do kilku setnych Daltona* identyfikuje cząsteczkę, której masa teoretyczna obliczana jest na podstawie mas atomów wchodzących w jej skład. Dedukcja sekwencji białka może być przeprowadzona wyłącznie na podstawie pomiaru zestawu mas peptydów tryptycznych w spektrometrze i porównania ich z masami obliczonymi teoretycznie (*in silico*) [29]. Metoda ta określana jest mianem 'masowego odcisku palca peptydu' (ang. *peptide mass fingerprinting*, PMF). Wadą tej metody jest konieczność oczyszczenia identyfikowanego białka oraz względnie duże prawdopodobieństwo dopasowania mas na zasadzie czystego przypadku. Wady te czynią tę metodę mało wiarygodną i coraz rzadziej używaną.

W przypadku złożonych mieszanin białkowych z pomocą w identyfikacji przychodzi tzw. tandemowa spektrometria mas.

Tandemowa spektrometria mas (ang. *tandem mass spectrometry*, MS/MS)

Nie wchodząc w szczegóły, metoda ta dostępna jest dzięki zastosowaniu spektrometrów posiadających dwa analizatory, np. kwadrupol i analizator czasu przelotu (Q-TOF) lub analizator wyposażony w pułapkę jonową. W spektrometrze hybrydowym możliwy jest pomiar masy cząsteczki, a następnie rozbić jej na fragmenty i pomiar ich mas.

Identyfikacja białek w złożonej mieszaninie przypomina identyfikację doszczętnie zniszczonego wraku samolotu, który rozsypany się na drobne, porzucane i wymieszane części. Zbiera i segreguje się jego elementy. Przez porównanie ich parametrów ze znanymi i skatalogowanymi parametrami technicznymi poszczególnych podzespołów, identyfikuje się typ zniszczonego samolotu. Wystarczy nawet jeden zidentyfikowany element, aby z dużym prawdopodobieństwem określić jego pochodzenie. Podobnie, identyfikacja określonego białka odbywa się na podstawie znalezionych fragmentów wyjściowej sekwencji, określonych na podstawie tzw. widm mas (por. niżej). Moż-

liwe jest to pod warunkiem obecności poszukiwanego białka zawierającego zidentyfikowane sekwencje peptydowe w bazach sekwencji tworzonych w oparciu o analizę genomu, które przeszukiwane są odpowiednim narzędziem bioinformatycznym (np. MASCOT, SEQUEST) [27]. W sensie ścisłym techniki spektrometrii mas odczytują sekwencje tylko krótkich peptydów (średnio ok. 14 aminokwasów), a na ich podstawie, pośrednio identyfikowane jest wyjściowe białko.

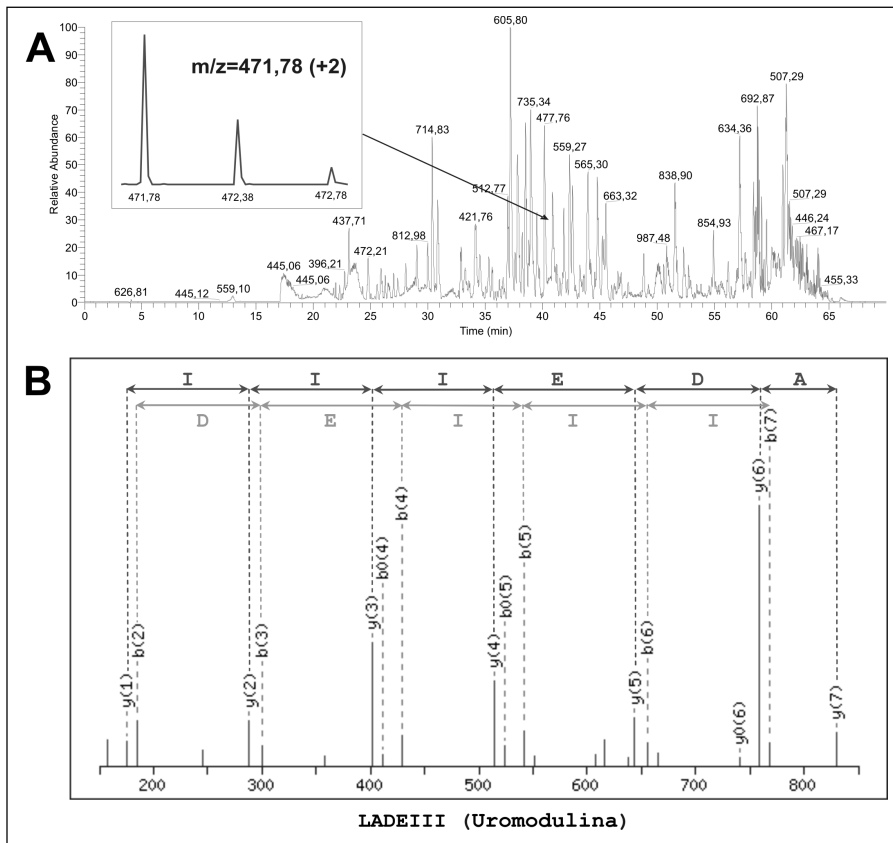
W tandemowej spektrometrii mas jony macierzyste (ang. *parent ions*), po zmierzeniu ich masy w pierwszym analizatorze, ulegają fragmentacji na tzw. jony potomne (ang. *daughter ions*), których masa mierzona jest w drugim sprzężonym analizatorze. W zależności od rodzaju spektrometru fragmentacja może odbywać się poprzez zderzenia jonów macierzystych z cząsteczkami gazu obojętnego (CID, ang. *Collisionally Induced Dissociation*) lub następować w wyniku przechwycenia elektronu z wiązki elektronów o niskiej energii skierowanej do komory, w której utrzymywane są jony (ECD, ang. *Electron Capture Dissociation*). W wyniku tego procesu powstaje widmo fragmentacyjne charakterystyczne dla jonu macierzystego (widmo MS/MS) (rycina 1). Fragmentacja *in silico* tego samego jonu macierzystego według znanych reguł powinna dać identyczne widmo MS/MS. Identyfikacja sekwencji polega na porównaniu widm fragmentacyjnych pochodzących z pomiaru MS/MS i widm teoretycznych, obliczonych dla wszystkich dostępnych sekwencji białek przechowywanych w bazach danych. Porównanie to daje wynik z określonym prawdopodobieństwem poprawnego przypisania sekwencji (określanym jako *score*), które uwzględnia jakość fragmentacji jonu macierzystego oraz dokładność pomiaru mas jonów.

Ustalenie sekwencji nowego, nieobecnego w bazach danych białka możliwe jest natomiast dzięki bardzo żmudnej i czasochłonnej metodzie sekwencjonowania *de novo*. Polega ona na ustalaniu kolejności i rodzaju aminokwasów w białku na podstawie analizy poszczególnych widm fragmentacyjnych. Stosowanie tej metody ogranicza się do zagadnień ściśle badawczych. Warunkiem koniecznym uzyskania wiarygodnej sekwencji białka jest wysoki stopień pokrycia sekwencjami peptydowymi, które określa się na podstawie analizy wielu widm fragmentacyjnych. (Sekwencje te nakładają się częściowo na siebie, a proces analizy przypomina trochę grę w domino.) W przypadku nie spełnienia tego warunku, sekwencjonowanie *de novo* metodą może prowadzić do niejednoznaczności i błędnych wniosków, na przykład w przypadku istnienia izoform lub blisko spokrewnionych homologów białek.

Podejście bottom-up versus top-down – możliwości i ograniczenia

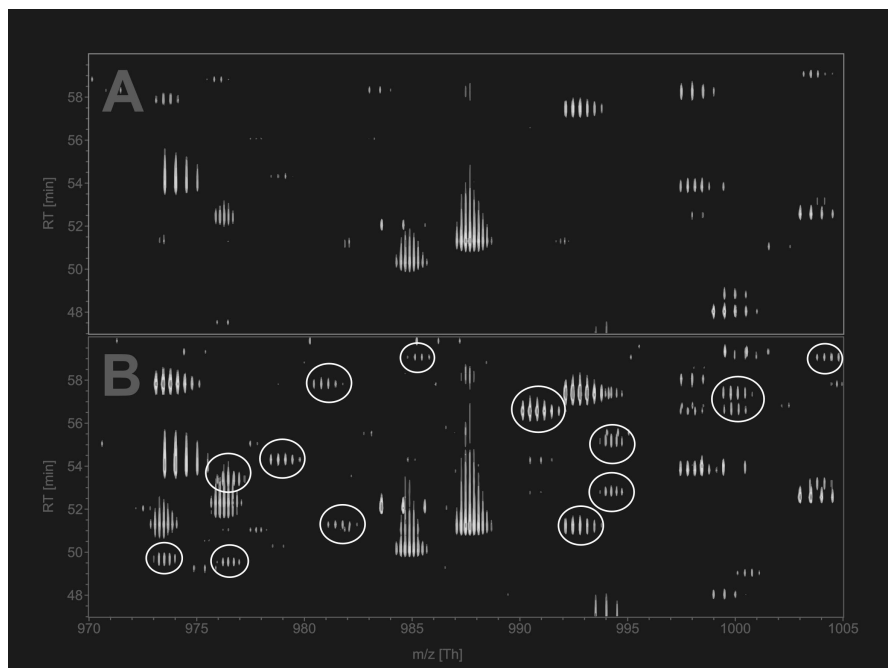
Metodologia opisana wyżej, w której na podstawie analizy mieszaniny krótkich fragmentów proteolitycznych wstępnie rozdzielanych *on-line* w układzie chromatografii

*przypis: (Dalton - powszechnie przyjęta atomowa jednostka masy - 1/12 masy atomu węgla C12. Masa cząsteczki określona w Daltonach odpowiada jej masie molowej, np. dla albumin ok. ~69 000 Da, tj. 69 000 g/mol)



Rycina 1 A
 Chromatogram przebiegu LC-MS. Peptydy rozdzielane na kolumnie chromatograficznej trafiają kolejno do spektrometru, gdzie poddawane są łagodnej jonizacji, a następnie mierzona jest masa jonów (naładowanych peptydów). Oś X przedstawia czas retencji, tj. czas elucji peptydu z kolumny chromatograficznej, Y - intensywności sygnałów naładowanych peptydów. Wewnętrzny panel przedstawia obwiednię izotopową jednego z peptydów wypływającego z kolumny w około 41 minucie przebiegu, tj. zestaw mas jonów (m/z) wynikający z naturalnego składu izotopowego. Jest to tzw. jon macierzysty, który może poddany być fragmentacji na mniejsze fragmenty. B: Widmo fragmentacyjne ww. peptydu pochodzącego z uromoduliny (białka Tamma-Horsfalla). Charakterystyczne dla danego peptydu widmo powstaje przez pomiar mas jonów potomnych powstających w wyniku ściśle określonych reguł (serie jonów b i y, tj. jonów z naładowaną grupą karbonylową lub aminową powstających po przerwaniu wiązań peptydowych).

The chromatogram of the LC-MS run. Peptides separated on the chromatographic column are directed in sequence into spectrometer where are subjected to mild ionization. Then, the masses of charged peptides are measured. The internal insert shows isotope envelope of the one of peptides eluted from the column at the 41 minute, e.g. the set of ion masses (m/z) resulting from natural isotope composition. This is so called parent ion, which can be subjected to farther fragmentation to the smaller pieces. B. Fragmentation spectrum of the peptide derived from uromodulin (Tamm-Horsfall protein). The characteristic spectrum of the peptide is composed of ion masses generated by strictly determined rules (series b and y ions, e.g. ions with charged carboxyl or amino group formed after cleavage of peptide bonds).



Rycina 2

Porównanie fragmentu map obrazujących skład peptydowy moczu osoby zdrowej (panel A) i pacjenta z rakiem pęcherza (panel B) uzyskanych w przebiegach MS. Na panelu B zaznaczono grupy pików (obwiednie izotopowe peptydów) charakterystyczne tylko dla próbki pobranej od pacjenta z rakiem pęcherza. Właśnie peptydy reprezentowane przez intensywności zaznaczonych grup sygnałów, po opracowaniu statystycznym mogą stanowić panel markerów białkowych choroby.

The comparison of the map fragment representing peptides composition from control healthy urine (A panel) either patient with bladder cancer (B panel) recorded in MS experiment. The pointed group of peaks differentiates sample from patient with bladder cancer. The peptides represented by signals intensities of the marked signals groups, may serve after statistical analysis as the markers panel of the disease.

Tabela 1

Schematy technik spektrometrii mas najczęściej wykorzystywane w proteomice pod kątem diagnostyki medycznej, z którymi można spotkać się najczęściej w literaturze.

The scheme of mass spectrometry techniques commonly used in proteomics for use in medical diagnostics, most frequently cited in current papers.

Skrót powszechnie stosowany w literaturze	Nazwa Techniki	Uwagi
TECHNIKI ROZDZIAŁU MIESZANIN BIAŁEK SPRZĘŻONE Z MS LUB MS/MS		
1.	LC	Liquid Chromatography (Chromatografia cieczowa)
2.	CE	Capillary Electrophoresis (Elektroforeza kapilarna)
TECHNIKI SPEKTROMETRYCZNE		
1.	MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight
2.	SELDI-TOF	Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation - Time of Flight
3.	ESI - LTQ - FTICR	Electrospray Ionisation - Linear Trap Quadrupole - Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance
4.	ESI - Q -TOF	Electrospray Ionisation - Quadrupole - Time of Flight

sprzężonej ze spektrometrem, identyfikuje się wyjściowe sekwencje macierzystych białek, określana jest w literaturze mianem *bottom-up*. Głównym jej ograniczeniem jest fakt, że zidentyfikowana jest tylko frakcja populacji peptydów proteolitycznych, a stopień pokrycia sekwencji jest stosunkowo niski. Zarówno informacja o obecności alternatywnych izoform białka jako wariantach splicingu (tj. różnych sposobów składania genów) oraz modyfikacjach potranslacyjnych jest w tej metodzie w dużej mierze tracona. Alternatywę do podejścia *bottom-up*, wykorzystywaną jednak na mniejszą skalę z braku opracowanych narzędzi bioinformatycznych, bardziej skomplikowanej aparatury i mniejszej czułości względem dużych cząsteczek, stanowi metodologia *top-down*. W metodzie tej do spektrometru wprowadzane są nietrawione proteolitycznie białka lub peptydy poddawane jonizacji w fazie gazowej i identyfikowane na podstawie masy ich jonów molekularnych. Technika ta umożliwia lepszą identyfikację modyfikacji potranslacyjnych oraz nie gubi informacji o rozmiarze wyjściowego białka, traconej z założenia w proteolitycznym podejściu *bottom-up*. Ograniczenie stanowi tu masa cząsteczki analizowanych białek do 50 000 Da, ale wprowadzane są modyfikacje umożliwiające analizę większych cząsteczek [17,28]. Problemem utrudniającym interpretację wyników jest w tej technice generowanie z dużych cząsteczek nietrawionych białek jonów wielokrotnie naładowanych, a także słabiej poznany mechanizm jonizacji dużych białek w fazie gazowej.

Podkreślić należy, że bez względu na możliwość identyfikacji na podstawie widma mas poszczególnych białek lub ich fragmentów tworzonych na przykład w warunkach zwiększonej aktywności proteaz w procesie nowotworowym [19], sam rozkład sygnałów w widmie, jego obwiednia lub inna cyfrowa reprezentacja, stanowi specyficzny wzór identyfikujący stan chorobowy, pod

warunkiem zastosowania odpowiednich metod rozpoznawania wzorców (ang. *pattern recognition*) [20,43]. Jego zastosowanie diagnostyczne jest jednak wątpliwe ze względu na dużą zmienność i zależność od wielu czynników, sposobu przygotowania próbki oraz wzajemnych zależności między intensywnościami sygnałów tłumionych przez sygnały współobecnych w próbce peptydów.

Technika SELDI-TOF

Powszechna w analizie materiałów biologicznych technika spektrometrii mas SELDI-TOF-MS (ang. *Surface Enhance Laser Desorption Ionization*) sprzężona z detektorem czasu przelotu (TOF) (por. tabela 1) opiera się na analizie białek i peptydów zaczepionych na powierzchni aktywnej chemicznie matrycy o właściwościach złoża chromatograficznego. Matryca ta wiąże określony typ białek (np. hydrofobowych) w zależności od jej z góry zaprojektowanych właściwości chemicznych (system *Ciphergen's Protein-Chip*). Białka niezwiązane oraz zanieczyszczenia, np. sole, mogą być z tego układu usunięte przez wypłukanie już po nałożeniu próbek. Technika SELDI umożliwia ilościową detekcję na podstawie intensywności sygnałów jonów, jednak interesujący jon o określonej masie musi być następnie zsekwenconowany innymi metodami (np. tandemową spektrometrią mas), gdyż technika ta nie daje możliwości analizy sekwencji peptydowej.

Z racji dobrej powtarzalności oraz możliwości oceny ilościowej, technika SELDI potencjalnie nadaje się do tworzenia i identyfikacji profili sygnałów pod kątem opracowania klasyfikatorów stanów chorobowych. Jednak należy zwrócić uwagę, że oparcie klasyfikatora o intensywności sygnałów pochodzących od bliżej nie zidentyfikowanych tu białek, przypomina podejście czarnej skrzynki nie wyjaśniające powiązań i mechanizmów patofizjologicznych.

Analiza danych proteomicznych w diagnostyce – trudności do pokonania

Warunkiem umożliwiającym wykorzystanie danych proteomicznych pod kątem diagnostycznym, tj. tysięcy zidentyfikowanych peptydów wraz z intensywnościami sygnałów jonów macierzystych w chromatogramach MS, jest zbudowanie klasyfikatora danych o czułości i specyficzności umożliwiającej pewne potwierdzenie lub wykluczenie choroby. Klasyfikator jest narzędziem, które na podstawie pewnego zbioru cech (w wypadku proteomiki peptydów lub białek) jest w stanie, z pewnym, możliwym do oszacowania prawdopodobieństwem błędu, przypisać aktualnie badaną próbkę do jednej z dwóch lub więcej grup reprezentujących różne stany kliniczne, np. stan patologii i normy. W zagadnieniach biomedycznych powszechnie stosowane są klasyfikatory oparte o sztuczne sieci neuronowe (ang. ANN – *artificial neural networks*), maszyny wektorów wspierających (ang. SVM – *support vector machines*) czy drzewa decyzyjne.

Klasyfikator może być zbudowany w oparciu o pełny zbiór zmierzonych cech lub o ich podzbiór, wybrany za pomocą metod selekcji cech różnicujących (ang. *feature selection*).

Zakres klasyfikatora (ilość uwzględnionych cech) dobiera się tak, aby jego siła dyskryminacji (tj. różnicowania) była jak największa. Przykładem procedury selekcji elementów klasyfikatora jest procedura iteracyjna zwana rekursywnym zastępowaniem cech (ang. RFR – *Recursive Feature Replacement*). Z początkowego klasyfikatora wycofuje się jeden element, sprawdzając efektywność modyfikacji siły dyskryminacji, po czym wybiera się najlepszy model [22]. Klasyfikator tworzony na zbiorze uczącym (zbiór próbek o znanym przypisaniu do grupy) jest następnie testowany (walidowany) na zbiorze poddawanym ana-

lizie (klasyfikator nie posiada wiedzy o przypisaniu próbek do konkretnych grup). W przeciwieństwie do zwykłej diagnostyki opartej na zakresach referencyjnych dla pojedynczych markerów, tutaj siła dyskryminacji oparta jest na analizie zestawu wielu białek lub peptydów, niekoniecznie o największej intensywności. Poziom ich ekspresji może zmieniać się nieznacznie lub według skomplikowanych nieintuicyjnych zależności, które jednak analizowane łącznie, tworzą profil specyficzny dla choroby. Opis szczegółów matematycznych tej metodologii wykracza jednak poza ramy tego opracowania.

Pytanie, jaki zbiór peptydów obecnych w chromatogramie MS najlepiej odróżni stan normy od patologii z największą czułością i specyficznością, pozostawia zawsze wiele wątpliwości. Z założenia tylko przy osiągnięciu odpowiedniej siły dyskryminacji 'ciekła biopsja' zastąpić może np. inwazyjną biopsję nerki. Przy przeciwwskazaniach do jej wykonania, proteomiczna alternatywa może okazać się jednak najlepszą metodą, mimo ułomności i ograniczeń co do czułości i swoistości, obecnych także w przypadku innych metod uzupełniających kompleksową diagnostykę. Opracowanie uniwersalnej metody klasyfikacji statystycznej to główne trudności do pokonania na drodze wdrażania ww. analiz do diagnostyki medycznej. Do tego dodać należy konieczność standaryzacji technik pobierania próbek moczu i eliminacji zanieczyszczeń, kwestie techniki wstępnego rozdziału białek, lub metody ilościowej oceny intensywności sygnałów. Odrębnym problemem jest określenie zmienności osobniczej proteomu moczu, wpływu diety, płci i wieku. Wszystkie te czynniki wpływają na subtelny obraz danych uzyskiwanych w spektrometrii mas [45].

Proteomika moczu i „ciekła biopsja”

Charakterystyka ureoproteomu (tj. profilu białkomoczu) podejmowana jest przy wielu zagadnieniach klinicznych, skutkując m.in. utworzeniem bazy danych *The Human Kidney and Urine Proteome Project* (www.hkupp.org) finansowanej przez *World Human Proteome Organisation* lub projektów w ramach EuroKUP (*European Kidney and Urine Proteome*). W dalszym ciągu zebrane dane nie są ani zbyt liczne, ani w pełni zweryfikowane, nie ma również wypracowanych, jednolitych metod analizy, przez co rutynowe wykorzystanie technik proteomicznych w diagnostyce medycznej to kwestia czekająca na dalsze dopracowanie. Techniki spektrometrii mas stosowane ostatnio w badaniach z zakresu urologii i nefrologii opierają się o różne schematy (tabela I) [30,48]. Pierwsze badania proteomiczne moczu zostały dokonane jednak już w 1979 roku, za pomocą elektroforezy dwukierunkowej [2]. Obecnie podejmuje się próby analiz proteomicznych moczu w celu powiązania typu glomerulopatii z wzorcem białek wykrytych w 'ciekłej biopsji' [49], monitorowania nerkowej postaci tocznia i efektów leczenia [32], diagnostyki raka pęcherza [41], raka prostaty [1], raka nerki [11], weryfikacji stadium przewlekłej choroby nerek w tym nefropatii cukrzycowej [46] lub monitorowania subklinicznego odrzucenia przeszczepu [34]. Perspektywy analizy proteomu moczu nie ogranicza-

ją się jednak do diagnostyki chorób układu moczowego i nerek [20,43,50].

„Ciekła biopsja” (ang. *fluid biopsy*) oparta na analizie składu białek moczu techniką MS sprzężoną z elektroforezą kapilarną (CE-MS) pozwoliła odróżniać pacjentów z nefropatią IgA od innych glomerulopatii ze specyficznością 100%, jednak tylko z 77% czułością. Analiza peptydomu (tj. białek o niskiej masie cząsteczkowej) moczu umożliwiła różnicowanie chorych od osób zdrowych, także w przypadku pełnej remisji i nieobecności patologicznego białkomoczu [18,24]. Poziom analizowanego białkomoczu nie wpływał przy tym na profil sekrecji peptydów umożliwiających różnicowanie nefropatii IgA i innych uwzględnionych w analizie chorób nerek lub próbek otrzymanych od osób zdrowych. W badaniach tych analizę różnicową przeprowadzono tylko w oparciu o intensywności sygnałów dla określonych wartości stosunków m/z bez zidentyfikowania odpowiadających im sekwencji peptydowych. Różnicowanie nerkowej postaci tocznia u dzieci z osobami zdrowymi na podstawie analizy markerów białkowych moczu za pomocą techniki SELDI-TOF pozwoliło osiągnąć wartość parametru ROC (ang. receiver operating characteristics) charakteryzującego czułość i specyficzność na poziomie 0.9. Analizę oparto na intensywności zaledwie kilku sygnałów jonów peptydów o wartościach m/z 22, 23, 44, 79 i 100 kDa [44]. Podkreślić należy, że tylko czułość i swoistość bliskie 100%, praktycznie niemożliwe do osiągnięcia, dorównywałyby wiarygodności badania histopatologicznego. Niemniej, metody proteomiczne ograniczyć mogą konieczność wykonywania na przykład biopsji kontrolnych w przypadku choroby już rozpoznanej i udokumentowanej na podstawie pierwszej biopsji.

Proteomika stwarza również potencjalne możliwości diagnostyczne w urologii. Rak pęcherza moczowego wykrywany jest poprzez inwazyjną cystoskopię z pobraniem materiału biopsyjnego lub bezinwazyjnie na podstawie cytologii moczu. Chociaż cytologia moczu (ang. voided urine cytology) pozostaje przesiewową nieinwazyjną metodą z wyboru o dużej specyficzności rzędu 94%, jej czułość waha się w szerokich granicach od 43% do 91% [14,31]. Diagnostyka oparta na znanych markerach białkowych raka pęcherza w moczu, m.in. NMP-22 (*nuclear matrix protein-22*), BTA (*bladder tumor antigen*), UBC (*urine bladder cancer antigen*) nie wykazuje wystarczającej czułości i specyficzności i służyć może jedynie jako diagnostyka uzupełniająca [6]. Metody proteomiczne stwarzają możliwości znalezienia nowych markerów o znaczeniu diagnostycznym, a zarazem analizy szerokich zestawów białkowych, pełniej reprezentujących obraz choroby niż pojedyncze markery. Ich rutynowe wykorzystanie w diagnostyce medycznej wymaga jednak wielu dalszych badań i walidacji metodologii.

Oprócz analizy proteomicznej moczu podejmowane są również analizy proteomu tkanek, w tym poszczególnych elementów tkanki nerek (ang. kidney tissue proteomics) lub innych narządów [35]. Techniki spektrometrii mas w tym kontekście mogą okazać się uzupełnieniem do analizy za pomocą

mikroskopii fluorescencyjnej lub elektronowej. Tego typu analizy oparte są jednak na inwazyjnym pobraniu materiału biopsyjnego i wychodzą poza przedmiot tego opracowania.

Podsumowanie

Idea wykorzystania metod proteomicznych w diagnostyce medycznej opiera się na założeniu, że jednoczesna analiza znacznej liczby parametrów, w tym przypadku poziomów ekspresji wielu wybranych białek i peptydów, o sile diagnostycznej zoptymalizowanej metodami bioinformatycznymi, pozwala stworzyć czuły i swoisty dyskryminator stanu chorobowego. Dane uzyskane za pomocą spektrometrii mas stwarzają podstawę do opracowania „białkowego odcisku palca” choroby, uwzględniającego wzajemne zależności patofizjologiczne przekładające się na profil wydzielanych białek. Miejsce proteomiki w nefrologii i urologii jest szczególne, ale proteomiczna analiza moczu wykorzystywana może być również w innych chorobach. Założenia proteomiki, być może obce klinicyście, nie powinny dziwić. Także na przykład optyczna analiza histopatologiczna opiera się na złożonej analizie widmowej, tyle że widma elektromagnetycznego w zakresie widzialnym i przez to wydawać się może bardziej intuicyjna. Analiza proteomu, a więc pochodnej stanu fizjologii tkanek, stanowi analogiczne podejście, w którym oko ludzkie zastępuje czuły spektrometr mas. Jakkolwiek, przyszłe wykorzystanie potencjału metod proteomicznych w urologii wymaga szerokiej współpracy interdyscyplinarnej. Także metody bioinformatycznej klasyfikacji danych proteomicznych, mimo swojego dynamicznego rozwoju, wymagają dalszego dopracowania.

Piśmiennictwo

1. Adam B.L., Vlahou A., Semmes O.J. et al.: Proteomic approaches to biomarker discovery in prostate and bladder cancers. *Proteomics Review* 2001, 1, 1264.
2. Anderson N.G., Anderson N.L., Tollaksen S.L.: Proteins of human urine. I. Concentration and analysis by two-dimensional electrophoresis. *Clin. Chem.* 1979, 25, 1199.
3. Andersson M., Nilsson U., Hjalmarsson C. et al.: Mild renal ischemia-reperfusion reduces charge and size selectivity of the glomerular barrier. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2007, 292, F1802.
4. Bailey H.S.: Mass spectrometry as a clinical research tool. *SD. J. Med. Pharm.* 1955, 8, 168.
5. Barratt J., Topham P.: Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease. *Review. CMAJ* 2007, 177, 361.
6. Boman H., Hedelin H., Holmäng S.: Four bladder tumor markers have a disappointingly low sensitivity for small size and low grade recurrence. *J. Urol.* 2002, 167, 80.
7. Bonventre J.V.: Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A specific and sensitive biomarker of kidney injury. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2008, 68, 78.
8. Chakraborty J., Below A.A., Solaiman D.: Tamm-Horsfall protein in patients with kidney damage and diabetes. *Urol. Res.* 2004, 32, 79.
9. Chen G., Pramanik B.N.: LC-MS for protein characterization: current capabilities and future trends. *Review. Expert Rev Proteomics.* 2008, 5, 435.
10. Christensen E.I., Nielsen R.: Role of megalin and cubilin in renal physiology and pathophysiology. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2007, 158, 1.
11. Craven R.A., Banks R.E.: Understanding and managing renal cell carcinoma: can proteomic studies

- contribute to clinical practice? *Contrib Nephrol. Review* 2008, 160, 88.
12. **Devarajan P.**: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. (Suppl.)* 2008, 241, 89.
 13. **Domon B, Aebersold R.**: Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 2006, 312, 212.
 14. **Eissa S., Salem A.M., Zohny S.F., et al.**: The diagnostic efficacy of urinary TGF-beta1 and VEGF in bladder cancer: comparison with voided urine cytology. *Cancer Biomark.* 2007, 3, 275.
 15. **Fowler K.T., Hugh-Jones P.**: Mass spectrometry applied to clinical practice and research. *Br. Med. J.* 1957, 1, 1205.
 16. **Gonzalez-Buitrago J.M., Ferreira L., Lorenzo I.**: Urinary proteomics. *Clin. Chim. Acta* 2007, 375, 49.
 17. **Han X., Jin M., Breuker K. et al.**: Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses greater than 200 kilodaltons. *Science* 2006, 314, 109.
 18. **Haubitz M., Wittke S., Weissinger E.M. et al.**: Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2005, 67, 2313.
 19. **Heal W.P., Wickramasinghe S.R., Tate E.W.**: Activity based chemical proteomics: profiling proteases as drug targets. *Curr. Drug Discov. Technol.* 2008, 5, 200.
 20. **Hess S., Chen X.**: Applications of proteomics to the study of adipose tissue. *Methods Mol Biol.* 2008;456, 131.
 21. **Hillege H.L., Janssen W.M., Bak A.A. et al.**: Microalbuminuria is common, also in a nondiabetic, non-hypertensive population, and an independent indicator of cardiovascular risk factors and cardiovascular morbidity. *J. Intern. Med.* 2001, 249, 519.
 22. **Jarząb B., Oczko-Wojciechowska M.** [W:] *Proteomika i Genomika w biologii i medycynie*, pod red. B. Przewlockiej, XXIII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Kraków 2006.
 23. **Jones H.B.**: On a new substance occurring in the urine of a patient with mollities ossium. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 1848, 138, 55.
 24. **Julian B.A., Wittke S., Haubitz M. et al.**: Urinary biomarkers of IgA nephropathy and other IgA-associated renal diseases. *World J. Urol.* 2007, 25, 467.
 25. **Katayama M., Nakano H., Ishiuchi A. et al.**: Protein pattern difference in the colon cancer cell lines examined by two-dimensional differential in-gel electrophoresis and mass spectrometry. *Surg. Today* 2006, 36, 1085.
 26. **Mao Y., Zhou X.B., Pi D.Y., Sun Y.X.**: Constructing support vector machine ensembles for cancer classification based on proteomic profiling. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2005, 3, 238.
 27. **Matrix Science Ltd.**: <http://www.matrixscience.com>.
 28. **McLafferty F.W., Breuker K., Jin M. et al.**: Top-down MS, a powerful complement to the high capabilities of proteolysis proteomics. *FEBS J.* 2007, 274, 6256.
 29. **Merlini G., Pozzi C.**: Mechanisms of renal damage in plasma cell dyscrasias: an overview. *Contrib. Nephrol.* 2007, 153, 66.
 30. **M'Koma A.E., Blum D.L., Norris J.L. et al.**: Detection of pre-neoplastic and neoplastic prostate disease by MALDI profiling of urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 353, 829.
 31. **Moonen P.M., Kiemeny L.A., Witjes J.A.**: Urinary NMP22 BladderChek test in the diagnosis of superficial bladder cancer. *Eur. Urol.* 2005, 48, 951.
 32. **Mosley K., Tam F.W., Edwards R.J. et al.**: Urinary proteomic profiles distinguish between active and inactive lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006, 45, 1497.
 33. **Nickolas T.L., Barasch J., Devarajan P.**: Biomarkers in acute and chronic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2008, 17, 127.
 34. **Nickolas T.L., O'Rourke M.J., Yang J. et al.**: Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann. Intern. Med.* 2008, 148, 810.
 35. **Okamura N., Masuda T., Gotoh A., et.**: Quantitative proteomic analysis to discover potential diagnostic markers and therapeutic targets in human renal cell carcinoma. *Proteomics* 2008, 8, 3194.
 36. **Parikh C.R., Devarajan P.**: New biomarkers of acute kidney injury. *Review. Crit. Care Med.* 2008, 36, S159.
 37. **Pieper R, Gatlin C.L., McGrath A.M., et al.**: Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics* 2004, 4, 1159.
 38. **Pisitkun T., Johnstone R., Knepper M.A.**: Discovery of urinary biomarkers. *Mol. Cell Proteomics. Review* 2006, 5, 1760.
 39. **Pisitkun T., Shen R.F., Knepper M.A.**: Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2004, 101, 13368.
 40. **Roos P.H., Golka K., Hengstler J.G.**: Predictive biomarkers and signatures in urinary bladder cancer. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2008, 10, 243.
 41. **Schiffer E., Mischak H., Theodorescu D., Vlahou A.**: Challenges of using mass spectrometry as a bladder cancer biomarker discovery platform. *World J. Urol.* 2008, 26, 67.
 42. **Singhal S., Stein R., Vickrey E., Mehta J.**: The serum-free light chain assay cannot replace 24-hour urine protein estimation in patients with plasma cell dyscrasias. *Blood* 2007, 109, 3611.
 43. **Smith E.R., Zurawski D., Saad A. et al.**: Urinary biomarkers predict brain tumor presence and response to therapy. *Clin. Cancer Res.* 2008, 14, 2378.
 44. **Suzuki M., Ross G.F., Wiers K. et al.**: Identification of a urinary proteomic signature for lupus nephritis in children. *Pediatr. Nephrol.* 2007, 22, 2047.
 45. **Thongboonkerd V.**: Practical points in urinary proteomics. *Review. J. Proteome Res.* 2007, 6, 3881.
 46. **Thongboonkerd V.**: Searching for novel biomarkers and new therapeutic targets of diabetic nephropathy using proteomics approaches. *Contrib. Nephrol. Review* 2008, 160, 37.
 47. **Turgeon C., Magera M.J., Allard P. et al.**: Combined newborn screening for succinylacetone, amino acids, and acylcarnitines in dried blood spots. *Clin. Chem.* 2008, 54, 657.
 48. **Tyan Y.C., Guo H.R., Liu C.Y., Liao P.C.**: Proteomic profiling of human urinary proteome using nano-high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2006, 579, 158.
 49. **Varghese S.A., Powell T.B., Budisavljevic M.N. et al.**: Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007, 18, 913.
 50. **Ward D.G., Nyangoma S., Howard J. et al.**: Proteomic profiling of urine for the detection of colon cancer. *Proteome Sci.* 2008, 6, 19.
 51. **Warram J.H., Gearin G., Laffel L. et al.**: Effect of duration of Type I diabetes on the prevalence of stages of diabetic nephropathy defined by urinary albumin / creatinine ratio. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1996, 7, 930.
 52. **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.
 53. **Zhou G., Li H., DeCamp D. et al.**: 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. *Mol. Cell. Proteomics* 2002, 1, 117.
 54. **Zhou X., Zhou J.**: Antibody-microarrays on hybrid polymeric thin film-coated slides for multiple-protein immunoassays. *Methods. Mol. Biol.* 2007, 382, 259.