

Proteomika a fizjologia i patofizjologia nerek

MAŁGORZATA OŹGO, WIESŁAW F. SKRZYPCZAK,
AGNIESZKA HEROSIMCZYK, ANDRZEJ MAZUR*

Katedra Fizjologii Zwierząt i Cytobiologii Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt AR,
ul. Doktora Judyma 6, 71-466 Szczecin

*Equipe Stress Métabolique et Micronutriments, Unité de Nutrition Humaine, INRA Clermont-Ferrand/Theix,
Saint Genès, Champanelle, Francja

Ożgo M., Skrzypczak W. F., Herosimczyk A., Mazur A.

Proteomics in relation to renal physiology and pathophysiology

Summary

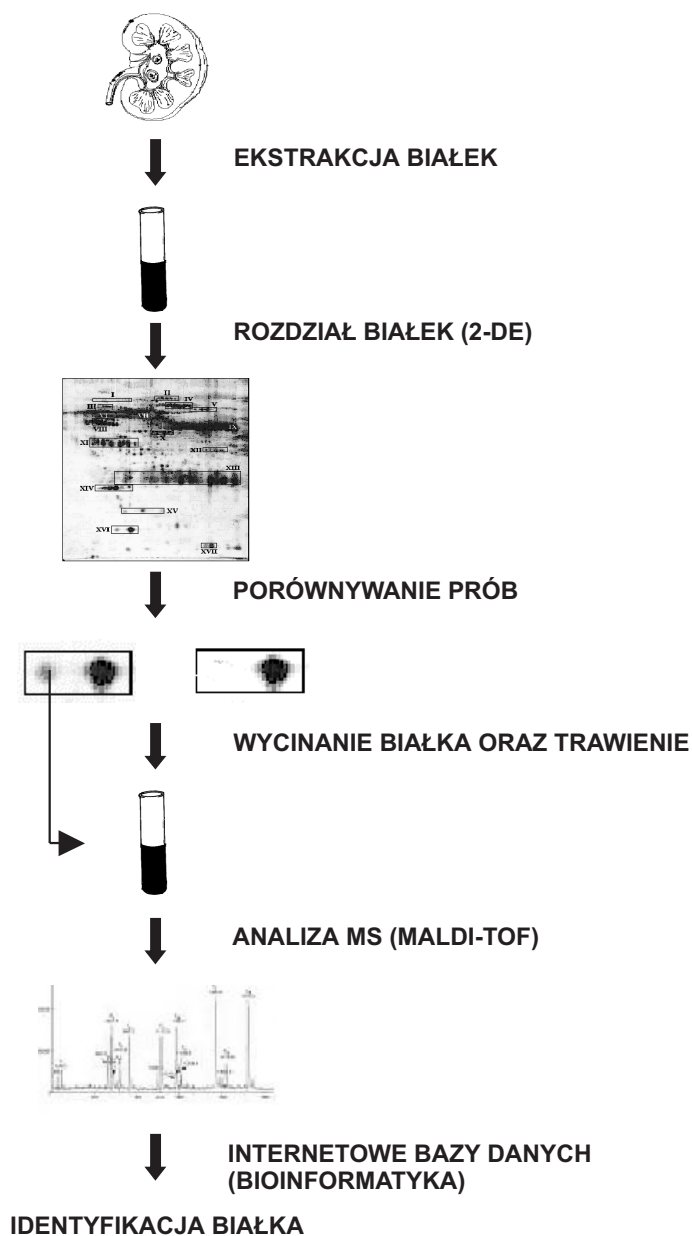
Proteomics is a new, dynamically developing branch of science. It uses specific research tools which enable analysis of a whole protein expression in definite time and a concrete biological system. The purpose of current applications of renal and urinary proteomics are to better understand renal physiology, to explore the molecular mechanisms of the occurrence and progression of diseases, and also to identify protein biomarkers. This review is intended to discuss the present status of the contribution of proteomic analysis to nephrology.

Keywords: proteomics, kidneys, urine, kidney diseases

Przełomowym odkryciem w świecie biologii molekularnej było zsekwencjonowanie genomu człowieka i wielu gatunków zwierząt. Niemniej jednak do pełnego zrozumienia funkcji zdrowego organizmu i zmian jego czynności w przebiegu chorób niezbędna jest znajomość poziomu ekspresji i struktury kodowanych przez genom białek, a także wzajemnych interakcji pomiędzy białkowymi produktami genów. Dynamicznie zmieniający się proteom (PROTEin complement to genOME), a nie kwasy nukleinowe, stanowi o przebiegu większości procesów fizjologicznych wewnątrz układu biologicznego. Powyższe stało się przyczynkiem szybkiego rozwoju nowej gałęzi nauki – proteomiki, która może być zdefiniowana jako całościowa analiza czasowej i przestrzennej ekspresji białek w określonym systemie biologicznym (4). Proteomika daje możliwość nie tylko identyfikacji białek obecnych w organizmie, narządzie, tkance, komórce, ale również pozwala na analizę ich modyfikacji potranslacyjnych (10). Ponadto porównywanie proteomów osób zdrowych i chorych umożliwia ustalanie przyczyn, mechanizmów i przebiegu schorzeń. Proteomika posiada ogromny potencjał, dlatego znajduje swoje zastosowanie w wielu gałęziach medycyny, między innymi w badaniach nad fizjologią i patofizjologią nerek.

Zarówno w genomice, jak i proteomice wykorzystywane są wysoko specjalistyczne techniki badawcze. Analiza ekspresji tysięcy genów jest możliwa dzięki wykorzystaniu mikromacierzy cDNA (12). Natomiast proteomika najczęściej opiera się na połączeniu dwóch

technik: elektroforezy dwukierunkowej w żelu poliakryloamidowym (two-dimensional gel electrophoresis – 2-DE) oraz spektrometrii masowej typu MALDI TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight). Elektroforeza dwukierunkowa jest najszerzej stosowaną metodą umożliwiającą jednoczesny rozdział tysięcy białek i późniejszą ich wizualizację. Z wysoką rozdzielczością pozwala na detekcję białek w szerokim zakresie, w zależności od ich punktu izoelektrycznego i masy cząsteczkowej. Punkt izoelektryczny (pI) jest definiowany jako określona wartość pH, przy której ładunek wypadkowy białka wynosi zero, co powoduje brak migracji tego białka w polu elektrycznym (6). Różnice pomiędzy punktami izoelektrycznymi poszczególnych białek są podstawą ich rozdziału. W pierwszym etapie 2-DE dokonuje się ogniskowania izoelektrycznego (IEF – isoelectric focusing) na wąskich paskach IPG (immobilised pH gradient) z żelem poliakryloamidowym, o określonym gradiencie pH. W drugim etapie przeprowadza się rozdział białek w zależności od ich masy cząsteczkowej, w żelu poliakryloamidowym z dodatkiem SDS (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis – SDS-PAGE). Rozdzielone cząsteczki identyfikuje się na podstawie ich masy. Jedną z najbardziej efektywnych technik wykorzystywanych w tym celu jest spektrometria mas (mass spectrometry – MS), która ze względu na wysoką czułość umożliwia analizowanie próbek o wysokiej „złożoności”. W badaniach proteomicznych MS stosowana jest m.in. w wykrywaniu interakcji pomiędzy białkami, modyfikacji potrans-



Ryc. 1. Schematyczny przebieg analizy proteomicznej

lacyjnych białek, mapowaniu poszczególnych przedziałów komórkowych oraz ilościowej analizie ekspresji genów w różnych stanach fizjologicznych i patofizjologicznych (17) (ryc. 1).

Wykorzystanie technik proteomicznych w badaniach czynności nerek

Nerki są narządem spełniającym funkcję wydalniczą, regulacyjną i endokrynną. Odgrywają zasadniczą rolę w selekcji i eliminacji zbędnych produktów przemiany materii, utrzymują homeostazę hormonalną oraz równowagę kwasowo-zasadową i elektrolitową ustroju (7, 11). U człowieka przez nerkę (która stanowi około 0,5% masy ciała) przepływa w ciągu minuty około 650 ml osocza. Z tej ilości powstaje około 120 ml przesączu kłębkowego. W trakcie pasażu przez nefron zachodzi selektywna sekrecja niektórych składników osocza do płynu kanalikowego oraz resorpcja wody

i innych elementów przesączu do krwi, co w rezultacie prowadzi do redukcji objętości płynu kanalikowego (do około 1% wielkości filtratu), który wraz z końcowymi produktami przemiany materii zostaje wydalony z organizmu.

Badania proteomiczne mają ogromne znaczenie w poznaniu i lepszym zrozumieniu czynności nerek, bowiem pozwalają na analizę, identyfikację i określenie funkcji szerokiej gamy białek wpływających bezpośrednio na nerki lub związanych z ich czynnością. Technika ta znajduje obecnie coraz większe zastosowanie w wielu ośrodkach naukowych. Sarto i wsp. (16) jako jedni z pierwszych przeprowadzili globalną analizę białek pochodzenia nerkowego (proteomu nerek). Autorzy stwierdzili ekspresję 2000 białek, spośród których 47 zidentyfikowali. Arthur i wsp. (2) przeanalizowali proteom w dwóch warstwach: korze i rdzeniu nerek. Wykazali, że ekspresja białek pomiędzy tymi regionami wykazuje znaczne różnice. W korze nerek stwierdzili ekspresję 1095, a w rdzeniu 885 białek. Spośród wszystkich białek tylko 72 zostały zidentyfikowane poprzez analizy spektrometrem masowym (MALDI TOF). Według autorów 10 zidentyfikowanych białek wykazywało większą ekspresję w korze, podczas gdy 6 białek wykazywało większą ekspresję w rdzeniu nerek. Podobne badania przeprowadzili Witzman i wsp. (23). W wyniku rozdzielania białek przy użyciu 2-DE i identyfikacji spektrometrem masowym, autorzy stwierdzili ekspresję 727 białek pochodzących z kory i 716 z rdzenia nerek. W badaniach tych autorzy wykazali różnice w ekspresji łącznie 127 białek, pomiędzy tymi dwoma warstwami.

Techniki proteomiczne umożliwiają również analizę białek pochodzących ze struktur wewnątrznerkowych, między innymi kłębuszka nerkowego. Należy zaznaczyć, że kłębki nerkowe nie tylko odgrywają decydującą rolę w filtracji osocza, ale również mogą być miejscem progresywnego rozwoju chorób nerek. Yoshida i wsp. (25) stworzyli mapę proteomu tej struktury, uzyskując ekspresję 1713 białek, spośród których 347 zidentyfikowali. Autorzy zaklasyfikowali te białka, na podstawie pełnionych funkcji, do białek cytoszkieletu i białek zaangażowanych w metabolizm DNA, RNA, węglowodanów i lipidów. Między innymi wykryli białko występujące na szczytowej błonie podocytów, o nazwie podocalexina, które pełni istotną rolę w przesyłaniu informacji pomiędzy środowiskiem zewnętrznym a podocytami. Yoshida i wsp. (25) wykryli również, metodami proteomicznymi, elementy cytoszkieletu (wimentynę, alfa i beta tubulinę, beta aktynę i miozynę). Wynikiem analizy proteomu kłębków przeprowadzonej przez autorów było stworzenie listy białek, które uległy ekspresji w ludzkim, zdrowym kłębuszku nerkowym. Lista ta umieszczona jest na stronie internetowej <http://www.sw.nec.co.jp/bio/rd/hgldb/index.html>. Również Ransom i wsp. (15) zidentyfikowali 88 unikalnych białek podocytowych i sugerują, że analiza zmian ekspresji tych białek może

pozwolić na lepsze zrozumienie mechanizmów powstawania proteinurii. Xing i wsp. (24) zaobserwowali u szczurów, u których występowała proteinuria, ekspresję białek błony szczelinowej i bocznych błon podocytów, takich jak: nefryna, podocyna, CD2AP (CD2-associated protein) i alfa-aktyna 4.

Wykorzystując techniki proteomiczne można analizować proteom kanalików nerkowych. Van Balkom i wsp. (21) przeanalizowali proteom kanalików zbiorczych nerek u szczurów otrzymujących analog wazopresyny (dAVP) – agonistę receptorów typu II, obecnych w bazolateralnej części błony komórkowej kanalików zbiorczych. Autorzy zaobserwowali różnicę w ekspresji 43 białek, pomiędzy kanalikami zbiorczymi szczurów doświadczalnych i kontrolnych. Uzyskane wyniki pozwoliły autorom określić m.in. rolę wazopresyny w regulacji determinantów indukcji tlenku azotu (syntazy tlenku azotu typu II, arginazy II, oksydazy NADPH).

Proteomika w sposób unikalny pozwala określić globalne zmiany w ekspresji białek wynikające z kontroli transkrypcyjnej i modyfikacji potranslacyjnych pomiędzy różnymi przedziałami komórkowymi, pod wpływem różnorodnych czynników. Dihazi i wsp. (5) przeprowadzili badania proteomiczne, których celem było określenie zmian w ekspresji białek, w komórkach nabłonkowych grubego ramienia wstępującego pętli nefronu, pod wpływem stresu osmotycznego. Autorzy eksponowali ww. komórki na ciśnienie osmotyczne wynoszące 900 mmol/kg H₂O i analizowali wpływ zwiększonej molalności na morfologię i zmiany proteomu. Wykazali ekspresję 2000 białek, zarówno w komórkach eksponowanych na wysokie, jak i fizjologiczne ciśnienie osmotyczne. Spośród nich, wykorzystując spektrometrię masową, zidentyfikowali 132 białka, z których, pod wpływem stresu osmotycznego, 25 uległo nadekspresji. Najbardziej charakterystyczną zmianą zaobserwowaną przez autorów była nadekspresja białka: reduktazy aldozy (AR), która redukuje d-glukozę w procesie powstawania alkoholu wielowodorotlenowego. Zmiany w ekspresji AR były 15-krotnie większe po wystąpieniu stresu osmotycznego. Według autorów, zwiększenie aktywności tego białka, indukowane wysoką molalnością zewnątrzkomórkową powoduje wzrost syntezy nerkowego sorbitolu i jego akumulację w komórkach kanalików zbiorczych rdzenia nerki. Sorbitol jest jedną z głównych organicznych substancji osmotycznie czynnych w rdzeniu nerek. Zdaniem autorów, jego akumulowanie chroni komórki nerek przed gwałtownymi zmianami osmotycznymi, wywieranymi przez skoncentrowane jony sodowe, chlorkowe i mocznik w śródmiąższu nerek. Autorzy stwierdzili również nadekspresję dehydrogenazy mleczanowej i dehydrogenazy jabłczanowej, enzymów zaangażowanych w metabolizm węglowodanów. Sugerują, że nadekspresja tych białek jest związana z aktywacją procesu glukoneogenezy, w celu dostarczenia odpowiedniej ilości glukozy do syntezy

sorbitolu. Dihazi i wsp. (5) zaobserwowali również nadekspresję kinazy adenylanowej i kinazy kreatyniny, białek odpowiedzialnych za utrzymanie odpowiedniego stężenia ATP w tkankach, niezbędnego w procesie pozyskiwania energii, przez komórki wstępującego ramienia pętli nefronu, będące pod wpływem stresu osmotycznego. Obserwowany wzrost ekspresji wimentyny (białka cytoszkieletu) w tych komórkach, w środowisku o wysokiej molalności jest, zdaniem autorów, związany ze stabilizacją i „wzmocnieniem” tych komórek.

Zastosowanie proteomiki w badaniach moczu

Techniki proteomiczne stały się bardzo ważnym narzędziem umożliwiającym identyfikację białkowych markerów obecnych w płynach ustrojowych np. w moczu. Należy zaznaczyć, że proteom moczu zawiera białka nie tylko przefiltrowane, ale również pochodzenia nerkowego. Analiza i identyfikacja tych białek może ułatwić zrozumienie fizjologii zarówno kłębków, jak i kanalików nerkowych (16). Proteom moczu może być również bardzo pomocny w analizie procesów patologicznych zachodzących w nerkach.

U zdrowych ludzi wydalanie białek z moczem w czasie doby nie powinno być wyższe niż 150 mg. W schorzeniach nerek ilość wydalanych białek może wzrastać, nawet do kilku gramów. Wittke i wsp. (22) wykazali w moczu zdrowych ludzi, wykorzystując technikę elektroforezy kapilarnej i spektrometrii masowej, ekspresję 1000 polipeptydów. Autorzy nie zaobserwowali różnic osobniczych w ich ekspresji. Uzyskane wyniki umożliwiły ustalenie prawidłowego wzoru polipeptydów w moczu zdrowych ludzi. W tym samym doświadczeniu Wittke i wsp. (22) porównali proteomy moczu osób zdrowych i z zaburzeniami czynności nerek. Zaobserwowali różnice w ekspresji polipeptydów – 27 z nich występowało w moczu osób chorych, a nie były obecne w moczu osób zdrowych, 13 polipeptydów występujących w moczu zdrowych pacjentów nie występowało u chorych. Badania proteomu moczu przeprowadzili również Adachi i wsp. (1). Autorzy w moczu zdrowych ludzi zidentyfikowali 1543 białka, wśród których 488 należało do białek błon komórkowych. Były to transportery wody (akwaporyny: AQP1, AQP2, AQP7), leków (MRP1 – multidrug resistance protein 1), sodu, potasu, chlorków (białka: solute carrier family 12 – formy 1, 2, 3; sodium/potassium-transporting ATPase gamma chain; potassium voltage-gated channel subfamily E forma 3; amiloride-sensitive sodium channel gamma-subunit). Na uwagę zasługuje fakt, że białka błon komórkowych zostały „przetransportowane” do moczu w formie niezmienionej. Oprócz białek błon komórkowych autorzy zaobserwowali występowanie w moczu również białek lizosomalnych i sugerują istnienie specyficznych ścieżek transportowych dla białek błonowych i lizosomalnych (formowanie egzosomów). Zidentyfikowane trzy akwaporyny (AQP1, AQP2,

AQP7) zlokalizowane były w szczytowej części błony komórkowej, natomiast nie występowały po stronie bazolateralnej. Również Pistikun i wsp. (14) stwierdzili wydalanie akwaporyny 2 do moczu w procesie formowania się egzosomów. Autorzy wykazali obecność w moczu białek transportujących będących integralną częścią błon komórkowych, różnych segmentów nefronów i sugerują, że analizy tych frakcji błonowych w moczu mogą dostarczyć informacji o fizjologii i patofizjologii kanalika nerkowego.

Możliwość nieinwazyjnego pobierania moczu oraz szeroka dostępność materiału jest dodatkowym argumentem uzasadniającym stosowanie technik proteomicznych w badaniach nerek. Zmiany w wydalaniu białek wraz z moczem dają istotne informacje pozwalające na poznanie mechanizmów odpowiedzi kanalików oraz kłębuszków nerkowych na stymulacje fizjologiczne.

Thongboonkerd i wsp. (20) na podstawie badań proteomu moczu ludzkiego stworzyli mapę białek. Autorzy zidentyfikowali 67 białek należących do transporterów, molekuł adhezyjnych, chaperonów, receptorów, enzymów, białka macierzy i białek sygnałowych. Zaobserwowali, że białka w „normalnym” moczu ulegają ekspresji jako rozsiane „pasy” białek, z niewielkimi różnicami w punkcie izoelektrycznym i masie cząsteczkowej. W innych badaniach proteomicznych Thongboonkerd i wsp. (19) scharakteryzowali białka w fizjologicznym moczu szczurów oraz wykazali zmiany w wydalaniu 111 białek wraz z moczem po obciążeniu szczurów sodem. Autorzy jako pierwsi zidentyfikowali białka: diphor-1, growth-associated protein 43, l-myc, które nie były wcześniej wykrywane w moczu, innymi metodami. Analizy proteomiczne, po obciążeniu szczurów dużym ładunkiem sodu, pozwoliły autorom na zidentyfikowanie w moczu obecności typowych białek błonowych komórek kanalików nerkowych, które mogą odgrywać bardzo ważną rolę w regulacji resorpcji sodu. Do białek tych należą: NEP 24.11, solute carrier family 3, meprin 1 alpha oraz ezrina. Szczególną uwagę autorzy zwrócili na potencjalną rolę białek: ezryny i aktyny. Sugerują, że ezrina, przyłączając się do aktyny, uczestniczy w formowaniu wielobiałkowego kompleksu wpływającego na hamowanie reabsorpcji NaCl w kanalikach proksymalnych.

Proteomika w wykrywaniu nowych markerów chorób nerek

Jednym z ważniejszych zadań proteomiki klinicznej jest identyfikacja biomarkerów w płynach biologicznych, które umożliwiłyby wczesne diagnozowanie choroby i/lub mogłyby znaleźć zastosowanie w prewencji schorzeń nerek.

Nowotwory, w tym nerek, są jednymi z najpoważniejszych problemów w medycynie. Skomplikowany mechanizm powstawania choroby i jej przebiegu w wielu przypadkach utrudnia właściwe postępowanie terapeutyczne. Wykorzystanie proteomiki do pre-

cyzyjnego diagnozowania i identyfikacji poszczególnych klas nowotworów daje nadzieje na zrozumienie molekularnego podłoża procesu nowotworzenia. Jednym z nowotworów dojrzałych nerek jest nowotwór RCC (rak jasnokomórkowy). Stanowi on około 2% wszystkich nowotworów tego narządu powodujących szybką śmierć, między innymi ze względu na późną wykrywalność tego schorzenia. Identyfikacja biomarkerów dla RCC była przedmiotem dociekań wielu autorów. Badania przeprowadzone przez Balabanova i wsp. (3) nad tym nowotworem u ludzi wykazały obniżoną ekspresję niektórych białek w nerkach. Autorzy zidentyfikowali je jako: enoyl-coA hydratazę, alpha-glicerol-3-dehydrogenazę fosforanową, dehydrogenazę aldehydową I i aminoacylazę I. Z kolei Kellner i wsp. (8) obserwowali we wczesnej fazie RCC nadekspresję białek: cytotekreatyny-8, statminy i wimentyny. Inni autorzy przeprowadzili analizę proteomiczną moczu u ludzi z nowotworem RCC. Wykazali zwiększoną ekspresję białka wiążącego retinol (retinol-binding protein), anhidrazy węglanowej I oraz beta 2 mikroalbuminy. Natomiast białka: lektyna wiążąca mannozę proteazy serynowej 2 oraz kininogen miały obniżoną ekspresję (13).

Bardzo ważne zastosowanie znalazła proteomika w identyfikacji biomarkerów w celu wczesnego wykrywania schorzeń kłębuszków nerkowych. Przykładem są badania Thongboonkerda i wsp. (18). Autorzy przebadali białka obecne w moczu ludzi z nefropatią cukrzycową oraz ze stwardnieniem kłębuszków nerkowych i porównali je z białkami występującymi w moczu ludzi zdrowych. Wykazali różnice w ekspresji 25 białek. W moczu zdrowych ludzi ekspresja: albuminy, transferyny i alfa-1-antytrypsyny była znacząco niższa w porównaniu z ekspresją białek w moczu pacjentów ze schorzeniami kłębuszków nerkowych. U osób zdrowych stwierdzono jednocześnie wysoką ekspresję kininogenu oraz proboliny-3.

Wykorzystanie technik proteomicznych do analizy zmian ekspresji białek związanych z wiekiem pozwala na dokładniejsze zrozumienie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za proces starzenia i stany chorobowe, w tym nowotwory nerek. Kim i wsp. (9) zaobserwowali w nerkach starzejących się szczurów wzrost ekspresji, między innymi, katepsyny B i katepsyny L, białek zaangażowanych w apoptozę komórkową. Według autorów, wysoka ekspresja tych białek może być związana z patologią nerek występującą w wyniku starzenia się organizmu. Spośród 103 zidentyfikowanych białek, które uległy ekspresji w nerkach u starzejących się szczurów Kim i wsp. (9) zwrócili szczególną uwagę na białko SMP30 (senescence marker protein 30). Niską ekspresję tego białka i jej obniżanie w procesie starzenia stwierdzono w nabłonkach kanalików nerkowych. SMP30 jest związane z utrzymaniem homeostazy wapnia w ustroju. Obniżona ekspresja tego białka z wiekiem prowadzić musi w konsekwencji do zaburzenia homeostazy wapnia,

poprzez upośledzenie funkcjonowania komórek kanałków nerkowych, prawdopodobnie na skutek zaburzenia wewnątrzkomórkowego systemu sygnałowego.

Proteomika dzięki wykorzystywaniu wysoko specjalistycznych technik badawczych, np. elektroforezy dwukierunkowej w żelu poliakrylamidowym oraz spektrometrii masowej typu MALDI TOF, daje możliwość szybkiej i precyzyjnej identyfikacji białek obecnych w badanych układach biologicznych (organizm, narząd, tkanka, komórka) oraz płynach ustrojowych (np. mocz). Stwierdzenie obecności (lub braku ekspresji) białek, ich identyfikacja oraz analiza interakcji i modyfikacji potranslacyjnych pozwalają na określenie funkcji szerokiej gamy białek wpływających bezpośrednio na nerki lub związanych z ich czynnością, co umożliwia lepsze zrozumienie czynności tego narządu. Ponadto porównywanie proteomów osób zdrowych i chorych umożliwia ustalanie przyczyn, mechanizmów i przebiegu schorzeń. Identyfikacja białkowych markerów w płynach biologicznych umożliwia wczesne diagnozowanie choroby i/lub może znaleźć zastosowanie w prewencji schorzeń nerek. Wykorzystanie technik proteomicznych do analizy zmian ekspresji białek związanych z wiekiem pozwala na dokładniejsze zrozumienie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za proces starzenia i stany chorobowe wieku starczego. Potwierdzeniem są wyniki pionierskich badań proteomu nerek, poszczególnych ich struktur oraz moczu, przeprowadzonych przez autorów cytowanych prac.

Piśmiennictwo

1. Adachi J., Kumar C., Zhang Y., Olsen J. V., Mann M.: The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol.* 2006, 7, R80.
2. Arthur J. M., Thongboonkerd V., Scherzer J. A., Cai J., Pierce W. M., Klein J. B.: Differential expression of proteins in renal cortex and medulla: a proteomic approach. *Kidney Int.* 2002, 62, 1314-1321.
3. Balabanov S., Zimmermann U., Protzel C., Scharf C., Klebingat K. J., Walther R.: Tumour-related enzyme alterations in the clear cell type of human renal cell carcinoma identified by two-dimensional gel electrophoresis. *Eur. J. Biochem.* 2001, 268, 5977-5980.
4. Cutillas P., Burlingame A., Unwin R.: Proteomic strategies and their application in studies of renal function. *News. Physiol. Sci.* 2004, 19, 14-119.
5. Dihazi H., Asif A. R., Agarwal N. K., Doncheva Y., Muller G. A.: Proteomic analysis of cellular response to osmotic stress in thick ascending limb of Henle's loop (TALH) cells. *Mol. Cell Proteomics* 2005, 4, 445-1458.
6. Herosimczyk A., Dejeans N., Sayd T., Ożgo M., Skrzypczak W. F., Mazur A.: Plasma proteome analysis: 2D gels and chips. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006 (Suppl. 7), 57, 81-93.
7. Higgins J. P. T., Wang L., Kambham N., Montgomery K., Mason V., Vogelmann S. U., Lemley K. V., Brown P. O., Brooks J. D., Rijn M.: Gene expression in the normal adult human kidney assessed by complementary DNA microarray. *Mol. Biol. Cell* 2004, 15, 649-656.
8. Kellner R., Lichtenfels R., Atkins D., Bukur J., Ackermann A., Beck J., Brenner W., Melchior S., Seliger B.: Targeting of tumor associated antigens in renal cell carcinoma using proteome-based analysis and their clinical significance. *Proteomics* 2002, 2, 1743-1751.
9. Kim C. H., Park D. U., Chung A. S., Zou Y., Jung K. J., Sung B. K., Yu B. P., Chung H. Y.: Proteomic analysis of post-mitochondrial fractions of young and old rat kidney. *Exp. Gerontol.* 2004, 39, 1155-1168.
10. Knepper M. A.: Proteomics and the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002, 13, 1398-1408.
11. Ożgo M., Skrzypczak W. F.: Układ renina-angiotensyna-aldosteron w okresie okołoporodowym i neonatalnym. *Medycyna Wet.* 1999, 55, 737-741.
12. Ożgo M., Skrzypczak W. F., Mazur A.: Mikromacierze cDNA w badaniach fizjologii i patologii nerek. *J. Elementol.* 2005, 10, 1177-1186.

13. Pieper R., Gatlin C. L., McGrath A. M., Makusky A. J., Mondal M., Seonara M., Field E., Schatz C. R., Estock M. A., Ahmed N., Anderson N. G., Steiner S.: Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics* 2004, 4, 1159-1174.
14. Pistikum T., Shen R. F., Knepper M. A.: Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2004, 101, 13368-13373.
15. Ransom R. F., Vega-Warner V., Smoyer W. E., Klein J.: Differential proteomic analysis of proteins induced by glucocorticoids in cultured murine podocytes. *Kidney Int.* 2005, 67, 1275-1285.
16. Sarto C., Marocchi A., Sanchez J. C., Giannone D., Frutiger S., Golaz O., Wilkins M. R., Doro G., Cappellano F., Hughes G., Hochstrasser D. F., Mocarelli P.: Renal cell carcinoma and normal kidney protein expression. *Electrophoresis* 1997, 18, 599-604.
17. Tarkowski B., Girstun A.: Zastosowanie spektrometrii mas w poszukiwaniach biomarkerów chorób nowotworowych. *Kosmos* 2005, 54, 331-343.
18. Thongboonkerd V., Klein J. B., Jevans A. W., McLeish K. R.: Urinary proteomics and biomarker discovery for glomerular diseases. *Contrib. Nephrol.* 2004, 141, 292-307.
19. Thongboonkerd V., Klein J. B., Pierce W. M., Jevans A. W., Arthur J. M.: Sodium loading changes urinary protein excretion: a proteomic analysis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003, 284, F1155-F1163.
20. Thongboonkerd V., McLeish K. R., Arthur J. M., Klein J. B.: Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int.* 2002, 62, 1461-1469.
21. Van Balkom B. W., Hoffert J. D., Chou C. L., Knepper M. A.: Proteomic analysis of long-term vasopressin action in the inner medullary collecting duct of the Brattleboro rat. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2004, 286, F216-F224.
22. Wittke S., Fliser D., Haubitz M., Bartel S., Krebs R., Hausadel F., Hillmann M., Golovko I., Koester P., Haller H., Kaiser T., Mischak H., Weisinger E. M.: Determination of peptides and proteins in human urine with capillary electrophoresis-mass spectrometry, a suitable tool for the establishment of new diagnostic markers. *J. Chromatogr. A* 2003, 1013, 173-181.
23. Witzmann F. A., Fultz C. D., Grant R. A., Wright L. S., Kornguth S. E., Siegel F. L.: Differential expression of cytosolic proteins in the rat kidney cortex and medulla: preliminary proteomics. *Electrophoresis* 1998, 19, 2491-2497.
24. Xing Y., Ding J., Fan Q., Guan N.: Diversities of podocyte molecular changes induced by different antiproteinuria drugs. *Exp. Biol. Med.* 2006, 231, 585-593.
25. Yoshida Y., Miyazaki K., Kamiie J., Sato M., Okuizumi S., Kenmochi A., Kamijo K., Nabetani T., Tsugita A., Xu B., Zhang Y., Yaoita E., Osawa T., Yamamoto T.: Two-dimensional electrophoretic profiling of normal human kidney glomerulus proteome and construction of an extensible markup language (XML) - based database. *Proteomics* 2005, 5, 1083-1096.

Adres autora: dr inż. Małgorzata Ożgo, ul. Doktora Judyma 6, 71-466 Szczecin; e-mail: malgorzata.ozgo@biot.ar.szczecin.pl