

**ANALISIS Y UTILIDAD DEL PROTEOMA
URINARIO EN EL DIAGNOSTICO
DIFERENCIAL DE LA DISFUNCIÓN
CRÓNICA DEL INJERTO RENAL**

Tesis presentada por:
Luis F. Quintana Porrás
Para optar al grado de Doctor en Medicina

Director de la tesis: Dr Josep M. Campistol

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Barcelona, 2009

**A mi madre y mi padre, por el afecto, la tenacidad y el apoyo
para comenzar**

A mi hija Sofía, por la motivación para llegar hasta el final

A Adriana, con quien he realizado todo

“De eso hablo: la responsabilidad. No sólo el derecho, sino el deber del hombre de ser responsable, la necesidad del hombre de ser responsable si desea permanecer libre; no sólo responsable ante otro hombre y de otro hombre, sino ante sí mismo; el deber de un hombre, el individuo, cada individuo, todos los individuos, de ser responsables de las consecuencias de sus propios actos, pagar sus propias cuentas, no deberle nada a otro hombre.”

William Faulkner

Publicado en Delta-Democrat Times , 18 de mayo de 1952

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis es el resultado del trabajo compartido durante varios años en el Servicio de Nefrología y Trasplante Renal y en el Laboratorio experimental de nefrología y trasplante (LENIT) del Hospital Clínic de Barcelona

Para todos los que allí trabajan o trabajaron y para nuestros pacientes solamente tengo palabras de agradecimiento y de aprecio. Algunos amigos y todos entrañables compañeros.

Gracias Campis, por la confianza, el apoyo y por tu capacidad de trabajo inagotable. Por dar-me las oportunidades necesarias y por creer que la tierra es del que la trabaja. Esto no te lo agradeceré jamás lo suficiente.

Gracias a las personas que han pasado por el LENIT, todas me habéis enseñado algo. Gracias Fritz, Elisenda, Mari, Jordi, Nacho, Dani, Natalia, Astrid, Marcelo. Gracias Alex por ser mi amigo, por el entusiasmo y la ayuda en el duro comienzo. Y especialmente, gracias Amanda por ser como eres, por tu empeño en el proyecto y por las ganas de aprender.

Gracias a Pedro R. Cutillas (Analytical Signalling Group, Centre for Cell Signalling, Institute of Cancer, Barts and the London and Queen Mary Medical School, Queen Mary University of London, UK) por la extraordinaria colaboración científica, por compartir con nosotros su firme convicción en el valor de la proteómica clínica.

Gracias a Joaquín Abian, científico Titular IIBB-CSIC, y a la gente de su laboratorio de proteómica. Gracias Miguel por la paciencia y colaboración durante las eternas horas de MALDI.

Gracias a Susana Kalko y al grupo de la unidad de bioinformática del IDIBAPS por su apoyo, asesoría e iniciativa.

Gracias al Dr Manel Solé por su colaboración y asesoría en el análisis histológico de las biopsias de injerto renal.

Gracias a todo el equipo de médicos y enfermeras de la UTR, liderado por el Dr Frederic Oppenheimer.

Gracias al Dr Albert Torras por su colaboración y confianza constante en este proyecto.

Gracias a todo el personal de enfermería del SNITR por dejarme campar a mis anchas, por vuestra ayuda en cualquier momento y por vuestro cariño.

Mi más profundo sentimiento de gratitud a los Doctores Jose I. Hernández y Hernando Altahona de Bogotá (Colombia) y Juli de Nadal (Barcelona) por enseñar-me respetar a la clínica por encima de todas las cosas en Medicina, pero sobretodo por sus valores humanos.

Finalmente el reconocimiento a mis abuelos Luis y Marina por ser fieles y enseñar-me las raíces, a mi hermana y Pablo, a los abuelos y tíos de Sofía.

INDICE

ABREVIATURAS	3
I. INTRODUCCIÓN	7
DISFUNCIÓN CRÓNICA DEL INJERTO (DCI)	14
Patogénesis de la DCI'	17
TECNOLOGÍA EN PROTEOMICA	24
Electroforesis bidimensional (2DE)'	25
Cromatografía líquida multidimensional (HPLC)	26
Espectrometría de masas de péptidos y proteínas	27
Ionización por láser asistida por matriz (MALDI).....	29
Ionización por electrospray (ESI)'	30
Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)	32
Secuenciación de péptidos mediante MS/MS	33
II-HIPOTESIS Y OBJETIVOS	37
Hipótesis	39
Objetivo general:	40
Objetivos específicos:	40
III. MATERIALES Y MÉTODOS	41
Diseño experimental	43
Sujetos de estudio	43
Histopatología.....	44
Análisis de anticuerpos anti-HLA.....	45
Obtención y purificación de la muestra de orina	45
Técnicas de espectrometría de masas utilizadas	46
IV. RESULTADOS	51
Primer trabajo	53
Urine proteomics to detect biomarkers for chronic allograft dysfunction. J Am Soc Nephrol. 2009 Feb; 20(2):428-35	53
Segundo Trabajo	63
Application of label-free quantitative peptidomics for the identification of urinary biomarkers of kidney chronic allograft dysfunction. Mol Cell Proteomics. 2009 Apr 7. [Epub ahead of print]	63
Patente	81
Healthy Kidney Biomarkers PCT/EP2008/060062. European Patent Office, The Hague.....	81
V. DISCUSIÓN	89
VI. CONCLUSIONES	99
VII. BIBLIOGRAFIA	105

ABREVIATURAS

En esta tesis han sido utilizados los siguientes acrónimos, algunos corresponden a siglas anglosajonas con el fin de utilizar nomenclatura internacional.

2DE: Electroforesis en gel bidimensional.

ACN: Acetonitrilo.

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

CAAR: Rechazo crónico activo mediado por anticuerpos.

CTGF: Connective tissue growth factor

CZE: electroforesis capilar

DIGE: Análisis de expresión diferencial en gel. (Differential in Gel Electrophoresis).

DCI: Disfunción Crónica del Injerto

EGF: epidermal growth factor

ESI: Electrospray.

FG: Filtrado glomerular

FWHM: Anchura de pico a media altura

HLA: Antígeno Leucocitario Humano

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography)

IC: Intervalo de confianza

ICR: analizadores de cicloronancia

IFTA: Fibrosis intersticial y atrofia tubular

IGF-I: insulin-like growth factor-I

IR: Infrarojo

IT: Trampa iónica (Ion Trap).

LC: Cromatografía Líquida

MALDI: Ionización/desorpción por láser asistida por matriz (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization).

MRM: Método ortogonal para validar la presencia de ión conocido en grupo independiente de muestras (Multiple Reaction Monitoring)

MS: Espectrometría de Masas

MS/MS: Espectrometría de masas en tándem.

MSn: Espectrometría de masas en tándem múltiple.

m/z: masa/carga

nESI: nanoelectrospray.

PAI I: Inhibidor del activador del plasminogeno tipo I

PDGF: platelet derived growth factor

Q: Cuadrupolo

QqQ: Triple cuadrupolo.

RAS: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (Sodium-Dodecyl-Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

SELDI: Surface enhanced laser desorption/ionisation

SPARC: Serin protein acidic and rich in cystein

Tag: Etiqueta.

TFA: Ácido trifluoroacético.

TGF- β :Factor de crecimiento transformante-beta

TOF: Tiempo de vuelo (Time Of Flight).
UV: Ultravioleta.
 μ ESI: Microelectrospray.
VEGF: vascular endotelial growth factor

I. INTRODUCCIÓN

El trasplante renal es la mejor opción disponible para el tratamiento de la enfermedad renal crónica avanzada, tanto en términos de supervivencia como de calidad de vida de los pacientes. La escasez de órganos disponibles para el procedimiento es la mayor limitación de este tipo de terapéutica y por tanto prolongar la vida útil de los injertos renales es la principal prioridad en el contexto del trasplante renal.¹⁻²

Después del primer año de funcionamiento del trasplante, la disfunción crónica del injerto (DCI) constituye la principal causa de daño y pérdida injerto renal. Esta entidad se ha definido como el mal funcionamiento del injerto, independiente del rechazo agudo, la nefrotoxicidad o la recurrencia de infección o nefropatía de novo; acompañada de los siguientes hallazgos histológicos: atrofia tubular, fibrosis intersticial, hiperplasia vascular intimal y glomerulopatía crónica del trasplante.³⁻⁵ Estudios mediante biopsia de protocolo han confirmado la elevada prevalencia de estas lesiones durante el primer año del trasplante en pacientes con función renal normal y estable⁵, por tanto el hallazgo de biomarcadores no invasivos de DCI, más sensibles y específicos, es uno de los retos urgentes de la investigación en el campo del trasplante renal.

La fisiopatología de la DCI es compleja y variable, ya que se trata de un proceso dinámico que evoluciona con el tiempo. La terapia inmunosupresora tiene que modularse en función de la evolución molecular de este proceso activo, para poder establecer la mejor estrategia en cada una de las fases de la historia natural de la DCI.⁵⁻⁶

La descripción del genoma humano cambió el abordaje de los fenómenos fisiopatológicos. La medicina entiende hoy a la enfermedad como el resultado de un cambio físico y/o químico que genera una alteración molecular y por tanto su propósito no se restringe al conocimiento de los cambios fenotípicos asociados, si no prioritariamente a comprender la patología, establecer el diagnóstico y diseñar la estrategia terapéutica a nivel molecular.⁷⁻⁸ Mediante la investigación en genómica se ha conseguido secuenciar el genoma de diversos organismos, incluido el ser humano. La medicina molecular ha modificado la percepción de la enfermedad por parte del enfermo y del médico, porque ahora la expectativa va más allá de la probabilidad estadística y se puede predecir la susceptibilidad de una entidad en la que se han identificado genes asociados. La genómica se complementa y amplía su impacto gracias a la proteómica, ya que la mera enumeración de los genes no informa de las funciones celulares y ninguna célula las expresa todas simultáneamente, sino que, dependiendo del tipo celular y de los estímulos que reciba, expresará una parte variable de su genoma; ⁹⁻¹¹ al igual que un arquitecto necesita de obreros para llevar a cabo sus proyectos, los genes necesitan de las proteínas para poder desarrollar su potencialidad y no sorprende que la diana del 90% de los fármacos sean las proteínas.¹²⁻¹⁴

Las proteínas se modifican postraduccionalmente, mediante fosforilación, glucosilación, acetilación, sulfatación, entre otras, y existen más de 200 tipos de modificaciones descritas. Estas modificaciones afectan a la estructura, localización, función y recambio, e implican funciones de activación, regulación,

respuesta al entorno, y asimismo son críticas para controlar los procesos de degradación de las proteínas.¹⁵⁻¹⁷

Por tanto, muchas proteínas están presentes bajo múltiples formas moleculares. Esta información, esencial, sólo se obtiene estudiando las proteínas y no los genes. Además, no hay una correlación directa entre los niveles de expresión de ARN (transcripción) y de expresión de proteínas. Cuando la proteína está presente en la célula (y puede detectarse) el ARNm ya no se detectaría. La expresión de un ARNm no informa de la actividad de la proteína que codifica ni de las posibles combinaciones o interacciones con otras proteínas que generan nuevas funciones.^{14,18-19}

Cada una de nuestras células contiene el genoma completo del ser humano. Sin embargo, no todos los genes se expresan en todas las células. La diferenciación celular para generar las distintas estirpes celulares y tejidos se debe a una expresión diferencial de genes. Así, aunque todas las células expresan unos genes comunes, cuyas proteínas proporcionan funciones esenciales, cada tipo celular expresará selectivamente aquellos que codifican las proteínas necesarias para realizar las funciones que le son específicas. El proteoma de cualquier célula, en un momento dado, representa sólo una fracción de todas las proteínas posibles que puede expresar el genoma.¹⁹⁻²⁰

Las proteínas que se expresan o que se modifican varían en función de las circunstancias, ataques del entorno, acción de fármacos, requerimientos energéticos. Existe un genoma, pero multitud de proteomas, y es el proteoma el que va a reflejar fielmente no una foto si no una película del estado celular.

^{19,21-22}

Actualmente podemos estudiar el conjunto total de proteínas de los componentes de las células o de los tejidos, en un tiempo muy inferior al empleado hace tan sólo unos años en conocer un único componente. La proteómica, el estudio de las proteínas de los seres vivos: su identidad y las interrelaciones entre ellas, inicia otro periodo favorable para la investigación clínica.⁹⁻¹¹

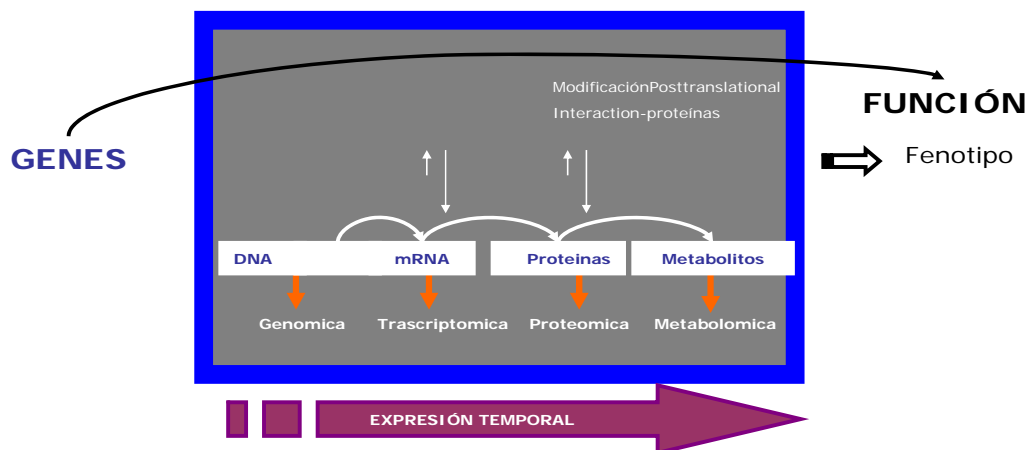


Figura 1. La función de las proteínas está ligada íntimamente con el flujo de información a nivel intra y extra celular y es reflejo real de la inter-relación entre la información almacenada en el material genético y la influencia del ambiente sobre el organismo.²³

El conocimiento de estas redes de señalización peptídica tendría un profundo impacto en el entendimiento de la biología, de los mecanismos patológicos y en el diseño de herramientas terapéuticas más racionales que actúen en fases

precoces de la enfermedad y conduzcan a desarrollar una medicina personalizada.²³⁻²⁴

DISFUNCIÓN CRÓNICA DEL INJERTO (DCI)

El trasplante renal es, por el momento, el tratamiento de elección en la insuficiencia renal crónica avanzada, con tres ventajas fundamentales respecto a la diálisis: mayor supervivencia del paciente, mejor calidad de vida y menor coste económico.¹ Los resultados actuales del trasplante renal avalan esta situación, y en la mayoría de estadísticas la supervivencia del injerto y del paciente supera el 95% al año del trasplante, y la incidencia de rechazo agudo se ha reducido drásticamente a cifras entre 10-15%. Sin embargo los resultados del trasplante renal a largo plazo no son tan alentadores porque se observa un estancamiento en la supervivencia a 10 años del trasplante.¹ En general, se acepta que la vida media de un injerto renal en trasplante de donante cadáver es de 11 años y en trasplante de donante vivo de 15 años, resultados bastante similares a los observados hace una década. Probablemente, el cambio en el perfil del donante cadáver, con un incremento significativo en la edad y la presencia frecuente de patología cardiovascular asociada (diabetes, hipertensión arterial), podría al menos en parte justificar esta discrepancia entre los resultados a corto y largo plazo del trasplante renal.

1-2

Después del primer año de funcionamiento del trasplante, la disfunción crónica del injerto (DCI) constituye la principal causa de daño y pérdida injerto renal. Está entidad se ha definido como el deterioro funcional progresivo del injerto, que puede o no estar asociado a hipertensión arterial y/o proteinuria acompañada de los siguientes hallazgos histológicos en la biopsia: atrofia

tubular, fibrosis intersticial, hiperplasia vascular intimal y glomerulopatía crónica del trasplante.³⁻⁵

En la práctica clínica, el diagnóstico de la DCI se realiza tardíamente, cuando las lesiones renales están avanzadas y en la mayoría de los casos el grado de fibrosis renal es importante. Esto se explica en parte porque el parámetro utilizado en el seguimiento de la función renal, la creatinina plasmática, tiene escasa sensibilidad para predecir lesiones renales incipientes y detectar la progresión del daño renal crónico.⁶

Desde la 8ª conferencia de Banff en 2005, se consideró no utilizar el término de Nefropatía Crónica del Injerto como término diagnóstico ya que su utilización genérica oculta otras múltiples causas inmunológicas o no inmunológicas que impiden un diagnóstico más específico y por consiguiente un tratamiento apropiado. Debemos distinguir el concepto de patología crónica del injerto secundaria a mecanismo inmunológico de aquellas otras patologías crónicas no relacionadas con un proceso inmunológico y entre las que destacamos: hipertensión arterial, toxicidad crónica, obstrucción, reflujo y/o nefritis crónica intersticial bacteriana y por último nefritis intersticial de causa vírica.²⁵ Esta multiplicidad de causas con mecanismos etiopatogénicos diferentes pero a la vez implicados o solapados, es una de las principales razones que dificultan el estudio histopatológico y una correlación clínica adecuada.

Debe sustituirse por una denominación descriptiva de fibrosis intersticial, atrofia tubular, y esclerosis glomerular cuando no se conoce una etiología ni se pueda establecer un mecanismo etiopatogénico. Dentro de los factores no inmunológicos la patología inherente al donante, sobre todo la lesión vascular y

el daño tóxico continuado por anticalcineurínicos ocupa un lugar preponderante.

La glomerulopatía del trasplante, la vasculopatía crónica y los depósitos de C4d en los capilares peritubulares, son indicadores de un mecanismo de rechazo humoral mediado por anticuerpos anti-donante. Es importante identificar el tipo de población inflamatoria intersticial asociada a estas lesiones crónicas ya que los infiltrados donde predominan macrófagos y células plasmáticas son de mal pronóstico.²⁵

Tabla I. Fibrosis Intersticial y atrofia tubular sin evidencia de etiología conocida (IF/TA) según conferencia de Banff 2005.

GRADOS

I LEVE	<25% área cortical
II MODERADA	26-50% área cortical
III SEVERA	>50% área cortical

Puede ser incluida lesión vascular no específica (tipo arterioescleroso y/o vasculopatía hipertensiva) así como % de glomerulosclerosis).

Tabla II. Rechazo crónico activo mediado por anticuerpos (CAAR) según conferencia de Banff 2005

- a) Doble contorno de la membrana basal glomerular y/o
- b) Multilaminación de la membrana basal de capilares peritubulares y/o
- c) IF/TA y/o
- d) Engrosamiento regular de la intima arterial
- e) C4d positivo en capilares peritubulares

En este sentido, la eliminación del término impropio nefropatía crónica del injerto y el reconocimiento de una nueva entidad denominada rechazo crónico activo mediado por anticuerpos de la clasificación histopatológica de Banff,

tenían como objetivo favorecer el diagnóstico etiológico temprano de los injertos disfuncionantes evitando encuadrar la mayoría de los casos dentro un grupo inespecífico de fibrosis y atrofia tubulo-intersticial.²⁵

La incidencia de DCI es progresiva en el periodo post-trasplante, siendo del 40% al final del primer año de trasplante renal, del 50% al final de los dos años y del 100% a los cinco años de trasplante.²⁶⁻²⁹ También se ha observado una elevada prevalencia de DCI en pacientes con función renal estable determinada mediante la creatinina plasmática. El estudio mediante biopsias de protocolo ha permitido definir que la presencia de DCI constituye un predictor independiente de supervivencia del aloinjerto renal^{5,30-31} que es independiente de la función renal en el momento de realizar la biopsia.³²⁻³³

Patogénesis de la DCI´

El conocimiento de los mecanismos patológicos de la DCI es insuficiente. Hoy en día, se acepta que el desarrollo y progresión de la DCI depende tanto de la respuesta alo-inmune como de otros factores no inmunes.²

La histocompatibilidad entre el donante y el receptor es uno de los factores determinantes de la supervivencia del injerto a largo plazo. La vida media del injerto entre gemelos HLA idénticos es de 20 años, mientras que si sólo comparten un haplotipo es de 10 años. En el trasplante renal de cadáver la supervivencia a largo plazo depende del número de identidades HLA. A los 3 años de seguimiento, la supervivencia del injerto es aproximadamente un 20% superior en los receptores que reciben un alo-injerto con seis identidades respecto a los receptores que reciben un injerto con ninguna identidad. Asimismo, se ha demostrado que el grado de sensibilización frente al panel de

anticuerpos en el momento del trasplante no sólo se relaciona con la supervivencia a corto plazo sino que también se relaciona con la supervivencia a largo plazo.³⁴

El rechazo agudo se asocia con el posterior desarrollo de la DCI. El número y la intensidad de los episodios de rechazo determinan el riesgo de aparición de DCI. Además, los rechazos tardíos, es decir, los rechazos que aparecen después de los 3 meses de seguimiento implican un peor pronóstico que los rechazos precoces.³⁵⁻³⁷

Entre los factores no inmunes cabe destacar las características antropométricas del donante y el receptor. La edad, el sexo y la raza del donante son factores que se relacionan con la supervivencia del injerto a largo plazo. Desde el punto de vista epidemiológico, cuanto mayor es la edad del donante, peor es la supervivencia del injerto.³⁸ Este efecto es más evidente cuando se trasplanta el riñón de donantes mayores de 50 años. El trasplante de riñones de mujeres a varones implica una supervivencia inferior que el trasplante de varones a mujeres. Asimismo, el trasplante de riñones de donantes de raza negra a receptores de raza blanca comporta una peor supervivencia a largo plazo que el trasplante de donantes de raza blanca a receptores de raza negra. Esta relación epidemiológica se explica porque el número de nefronas depende de la edad, el sexo y la raza.³⁸ El envejecimiento implica una pérdida progresiva de nefronas y el número de nefronas es aproximadamente un 20% inferior en las mujeres que en los varones y es superior en la raza blanca que en la raza negra. También se ha observado que los receptores de peso > 100 kg tienen una peor supervivencia a largo plazo

que los receptores de tamaño medio. Incluso se ha descrito que en las parejas de receptores que reciben los riñones de un mismo donante, la evolución es peor en el receptor más grande.³⁹⁻⁴⁰ Estos datos indican que el trasplante de un número inadecuado de nefronas en relación con el tamaño corporal del receptor conlleva un aumento del riesgo para el posterior desarrollo de DCI.⁴¹

El tiempo de isquemia fría no sólo se relaciona con la incidencia de necrosis tubular sino que es un predictor independiente de la supervivencia a largo plazo.⁴²

Si bien los fármacos inhibidores de calcineurina han permitido disminuir la incidencia de rechazo agudo, su efecto nefrotóxico también puede contribuir al desarrollo de la DCI. La nefrotoxicidad crónica por anticalcineurínicos se caracteriza por la aparición de fibrosis intersticial, atrofia tubular, isquemia y esclerosis glomerular. Estas lesiones son totalmente inespecíficas e indistinguibles de la DCI.⁴³⁻⁴⁴

En estos últimos años se ha observado que los factores relacionados con la aterogénesis como son los trastornos lipídicos o la hipertensión arterial también contribuyen a la progresión de la DCI, así como la infección por citomegalovirus tiene algún papel de en este contexto.⁴⁵

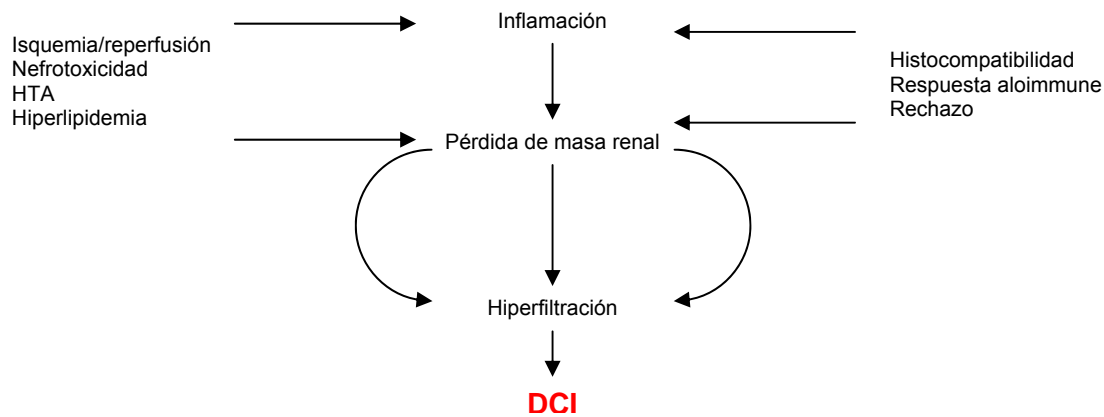


Figura 2. Mecanismo fisiopatológico de la DCI. La inflamación del injerto, ya sea debida a la respuesta alo-inmune o a una inflamación del antígeno independiente conlleva la lesión del injerto y la pérdida de masa renal que implica la hipertrofia de las nefronas remanentes. Este mecanismo de adaptación, una vez superado un umbral mínimo de masa renal, conducirá de forma irreversible a la esclerosis glomerular y consecuentemente a la progresión de la nefropatía crónica del trasplante.

En el desarrollo de la DCI existen dos circunstancias esenciales y simultáneas: la proliferación endotelial y la fibrosis intersticial. La lesión histológica predominante en la DCI es la fibrosis renal, con afectación glomerular, intersticial y vascular.⁴⁵ La progresiva sustitución del parénquima renal por tejido fibroso provocará una alteración de la función renal, con aumento en las cifras de creatinina plasmática y proteinuria, y a la larga conduce al paciente a la insuficiencia renal crónica terminal y al reinicio de diálisis.⁴⁶

En el desarrollo de fibrosis, el TGF- β de síntesis linfocitaria, macrófagica, tubular y mesangial representaría el principal inductor, actuando a través de tres acciones específicas:⁴⁷⁻⁴⁹

- Estimular la transcripción de genes y la producción de colágeno I,III,IV y VI, fibronectina, tenascina, osteonectina, osteopondina, trombospondina y glicosaminglicanos, componentes principales de la matriz extracelular.
- Aumentar la síntesis de los inhibidores de la proteasas (PAI-I, metaloproteasas) e inhibir la síntesis de proteasas como colagenasa y estromalina.
- Potenciar el ensamblaje de las fibras que componen la matriz extracelular.

Además, TGF- β tiene una potente acción inmunosupresora local e induce la síntesis de endotelina-1, potente factor vasoconstrictor. Existen evidencias en trasplante renal sobre el papel patogenico del TGF- β en el desarrollo de la DCI, y nuestro grupo definió la capacidad del bloqueo de la angiotensina II (losartan) para frenar el proceso de fibrosis y revertir la progresión de la DCI. ⁵⁰ Shihab et al. observaron el incremento en la expresión de TGF- β y en la síntesis de proteínas de matriz en animales de experimentación afectos de rechazo crónico. ⁴¹ La síntesis incrementada de TGF- β en el injerto renal estaría condicionada por dos factores, la angiotensina II y el tratamiento inmunosupresor con ciclosporina. También se ha prestado interés a genes y otros factores de crecimiento como : PDGF, ⁵¹ IGF-I, ⁵² EGF, ⁵³ CTGF, ⁵⁴ VEGF⁵⁵ que ven alterada su expresión por varios estímulos que acontecen durante (hipoxia, lesión por isquemia/reperfusión) o tras el trasplante renal (rechazo, muerte celular, inhibidores de la calcineurina, hipertensión). La complejidad en la interacción de estos factores aumenta cuando entra en juego la composición de la matriz extracelular, muchas de las acciones de estos factores de crecimiento vienen reguladas por ciertas proteínas como la trombospondina, la decorina o SPARC. ⁵⁴

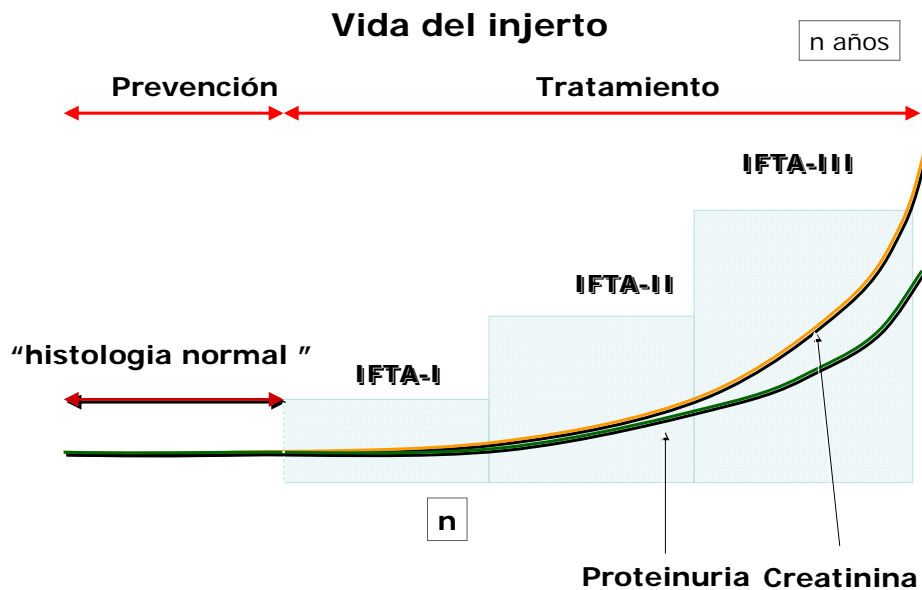


Figura 3. El proceso que genera la DCI es poco conocido. Actualmente los marcadores no invasivos disponibles (creatinina ,proteinuria) no reflejan los cambios tempranos asociados a esta entidad.

En la actualidad, no existen indicadores fiables y no invasivos para el diagnóstico precoz de la DCI, el primer indicador de disfunción del injerto utilizado en la práctica clínica es el aumento de la creatinina en suero, pero no es útil para detectar estadios iniciales por cuanto no existe correlación directa con la lesión histológica renal.^{6,56} Por este motivo la biopsia renal guiada por ultrasonido es la técnica de elección para el diagnóstico temprano de la DCI, aunque comporta una serie de gastos y riesgos para el paciente.⁶

Existen dos retos importantes en el contexto de la DCI que pueden ser abordados mediante análisis del proteoma urinario: realizar un diagnóstico preciso, precoz y no invasivo y profundizar en el conocimiento de la patogénesis para intentar prevenir o al menos diseñar herramientas terapéuticas a nivel molecular .

La orina humana es un fluido asequible que contiene marcadores biológicos útiles. La medida de proteínas en la orina ha sido utilizada desde hace muchos años para el diagnóstico y monitorización de muchas enfermedades renales. La orina de un individuo normal contiene aproximadamente 150 mg /24h de proteína. Estas proteínas provienen de la ultrafiltración del plasma y del tracto urinario mismo.

La orina es el "fluido biopsia" del riñón y del tracto urogenital, así muchos de los cambios anatómicos y funcionales experimentados en el riñón y tracto urogenital pueden ser detectados en el proteoma urinario. Además como filtrado de la sangre, contiene componentes proteicos que son similares a los encontrados en la sangre. Así, cambios patológicos aparecidos en otros órganos pueden detectarse en el plasma sanguíneo y por lo tanto pueden ser detectados en el proteoma urinario. La orina humana normal tiene una concentración de proteína muy diluida con un contenido alto de sal, que interfiere con el análisis proteómico. La purificación de la muestra es un paso crucial en estudios proteómicos de orina, para aislar y concentrar proteínas urinarias y para eliminar la interferencia de las sales. Hay múltiples protocolos de obtención y purificación de las proteínas urinarias, pero la falta de estandarización en las técnicas de purificación de la orina es uno de los inconvenientes de la proteómica urinaria. El método escogido tiene que tener en cuenta la cantidad (rendimiento de recuperación de proteína) y la calidad (los patrones obtenidos en 2-D o los perfiles de la espectrometría de masas).⁵⁷

El estudio del proteoma de orina se ha aplicado en la identificación de biomarcadores de enfermedades como mieloma múltiple,⁵⁸⁻⁵⁹ cáncer de

próstata⁶⁰ y el síndrome de Fanconi⁶¹ y en el contexto del trasplante renal para la búsqueda de biomarcadores en el rechazo agudo.⁶²⁻⁶⁶

Clarke y colaboradores desarrollaron un estudio con orina proveniente de 32 pacientes trasplantados en los que 17 tenían rechazo agudo confirmado con biopsia y el grupo restante tenían función renal estable y encontraron un grupo de picos diferentes en el perfil proteómico de los pacientes con rechazo agudo vs. pacientes trasplantados con función estable que diferenciaban las dos condiciones con un 83% sensibilidad y 100 % de especificidad.⁶²

El grupo de la universidad de Manitoba en Canadá realizó una comparación del perfil proteómico con SELDI-TOF entre 22 pacientes estables, 18 con rechazo agudo, 5 con necrosis tubular y 5 pacientes con recaídas de su enfermedad glomerular primaria, utilizando como población control 28 individuos sanos y 5 mujeres con infección de tracto urinario comprobada. Identificaron un patrón de picos que identificaba a 17/18 pacientes con rechazo agudo y que estaba conformado por m/Z 5270-5550, 7050-7360 y 10530-11100. En un estudio posterior describieron y secuenciaron este patrón de masas proteicas que correspondía a β_2 microglobulina clivada.^{63, 65}

Sin embargo, hasta la realización de esta tesis no había sido publicada ninguna aplicación de proteómica urinaria en el diagnóstico de la DCI.

TECNOLOGÍA EN PROTEOMICA

Aunque conceptualmente la proteómica es simple, en la práctica es compleja. La estrategia clásica en proteómica, consiste en separar y cuantificar las proteínas de una muestra (célula, tejido o fluido) por 2-DE⁶⁷ o cromatografía

multidimensional⁶⁸, y posteriormente identificar cada una de las proteínas mediante MS.²⁴ La mera cuantificación no refleja el estado funcional de la proteína, ni su localización o posibles interacciones con otras moléculas, por lo que la proteómica abarca muchas otras estrategias (caracterización de las modificaciones postraduccionales por MS, análisis estructural por difracción de rayos X o resonancia magnética, localización intracelular por microscopia confocal, etc.) que completan la descripción del proteoma.^{15,17,69}

Electroforesis bidimensional (2DE)

La 2-DE es una técnica de separación de proteínas que consiste en una sucesión de dos modalidades de electroforesis distintas realizadas sobre una misma muestra.⁶⁷ El tejido o células que se han de analizar se solubilizan en tampones que contienen agentes disociados y detergentes que facilitan la separación posterior de cada proteína individual. La primera dimensión es un electroenfoque, en el que las proteínas se separan en función de su punto isoeléctrico a lo largo de un gradiente de pH, y la segunda es una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de un detergente (PAGE-SDS), en la que la separación se produce en función de la masa molecular de las proteínas.⁷⁰⁻⁷¹

Hace más de tres décadas que se conocen estas técnicas; sin embargo, sólo recientemente se han conseguido soportes para el electroenfoque con gradientes de pH estables, reproducibles y disponibles comercialmente. Los 2-DE resultantes se tiñen con colorantes específicos de proteínas (Azul Coomassie, tinción con plata, compuestos fluorescentes, etc.), se digitalizan

mediante programas de imagen (Melanie, PDQuest), y se obtiene el conjunto de las proteínas de una muestra en un gel de 20 × 20 cm. Un avance reciente de la 2D-PAGE es la técnica DIGE una aproximación basada en el marcaje de las proteínas con diferentes fluorocromos y la separación de las muestras mediante 2D-PAGE en un mismo gel. Dicha metodología minimiza la variabilidad de los geles, disminuye el tiempo de análisis y permite una cuantificación del perfil de expresión muy precisa.⁷² En condiciones estándar, una muestra celular que contiene 100-300 µg de proteína total, genera 1.000-2.000 manchas (proteínas) y utilizando geles de mayores dimensiones, en laboratorios especializados, hasta 10.000.⁷¹

Las proteínas presentes en muy baja concentración o de características particulares (proteínas muy básicas o de membrana muy hidrofóbica) se detectan con dificultad. La utilización de geles expandidos o el fraccionamiento previo de las muestras para estudiar subproteomas concretos evita esos inconvenientes e incrementa considerablemente los niveles de detección.⁷²

Cromatografía líquida multidimensional (HPLC)

La HPLC es otra opción para la separación y cuantificación de proteínas. Se trata de una técnica analítica que separa las moléculas en función del tipo de soporte (columna cromatográfica) que se utilice (cambio iónico, fase reversa, afinidad, etc.). La HPLC en tándem, de forma análoga a la 2-DE, combina dos tipos diferentes de cromatografía mediante la conexión de dos columnas. Habitualmente la primera columna es de cambio iónico (separación por carga) y la segunda de fase reversa (separación por hidrofobicidad)⁷³. Aunque este

sistema permitiría la separación de mezclas de proteínas, se utiliza, por su mejor resultado, en la separación de péptidos. Actualmente estos cromatógrafos utilizan columnas capilares (75- 100 μm de diámetro interno y 5-10 cm de longitud) que permiten analizar muy poca cantidad de muestra (picomoles, femtomoles o incluso menos) rápidamente.

Así, por ejemplo, se consiguen identificar péptidos de proteínas presentes en muy baja concentración en la célula, que normalmente no se detectan en los geles 2-DE. Además, la HPLC se puede conectar directamente a un espectrómetro de masas, lo que permite la identificación automatizada de miles de péptidos.⁶⁸⁻⁷⁴

Espectrometría de masas de péptidos y proteínas

La espectrometría de masas es una tecnología que permite producir iones en fase gaseosa a partir de moléculas orgánicas o inorgánicas, clasificarlos en función de su relación m/z y medir su intensidad. Mediante esta técnica puede determinarse el peso molecular y la abundancia de los componentes de una mezcla. Los iones analizados pueden corresponder a moléculas enteras o fragmentos de moléculas, también conocidos como aductos.

Un espectrómetro de masas está formado por tres partes: la fuente de iones, el analizador y el detector. Las muestras a analizar son introducidas en la fuente de iones donde los componentes de la muestra son convertidos en iones en fase gaseosa. Estos iones son transferidos al analizador donde son acelerados y separados según su relación m/z utilizando diferentes principios físicos según

el tipo de analizador. Los analizadores se clasifican en cuatro grupos: de sectores (eléctricos y/o magnéticos), de cuadrupolo (Q), de tiempo de vuelo (TOF) y de atrapamiento de iones (analizadores de resonancia ciclotrónica (ICR) y trampas iónicas (IT)).⁷⁵

Por otro lado existe una gran variedad de métodos de ionización que se pueden dividir en suaves y duros, según la cantidad de energía que transfieren a las moléculas analizadas. Los métodos suaves generan iones en fase gaseosa con poca energía residual después de la ionización, mientras que los métodos duros depositan un exceso de energía sobre la muestra que origina la producción de múltiples fragmentos iónicos a partir de las moléculas originales.⁷⁵⁻⁷⁶

La aplicación de la MS a la secuenciación de péptidos fue descrita a finales de la década de los años 60. El método de derivatización que convertía los péptidos en sustancias volátiles y térmicamente estables y los analizaba por introducción directa en una fuente de impacto electrónico.⁷⁷ La complejidad de los espectros obtenidos aumentaba con el tamaño del péptido por lo que para obtener espectros con información estructural comprensible debían utilizarse péptidos de pequeño tamaño obtenidos por hidrólisis química o enzimática de la proteína en estudio.

La aparición de métodos de ionización suave por ESI y la ionización por MALDI permitió la generación de iones a partir de analitos no volátiles y de elevado peso molecular, sin una fragmentación significativa y son, debido a su eficiencia, las dos técnicas preferidas para el análisis de péptidos.⁷⁸⁻⁷⁹

Ionización por láser asistida por matriz (MALDI)

El MALDI utiliza pulsos de luz láser en la frecuencia del UV o del IR para desorber e ionizar la muestra previamente cristalizada junto a un compuesto denominado matriz.⁷⁹⁻⁸⁰ La matriz que se utiliza para la cristalización tiene dos funciones: la incorporación y dispersión de las moléculas del analito y la absorción de la energía de radiación para producir iones del analito a través de reacciones fotoquímicas. Las matrices más empleadas para el análisis de péptidos y proteínas son los ácidos sinapínico y α -ciano-4-hidroxicinámico, aunque para cada aplicación se han optimizado matrices que favorecen la formación de iones específicos. La transferencia de energía se realiza preferentemente mediante absorción resonante implicando transiciones electrónicas o cambios en los estados rotacionales o vibracionales. La energía absorbida produce una ablación de la superficie de la muestra y la vaporización e ionización de las moléculas de analito.⁸⁰

En MALDI, los iones del analito se forman principalmente por protonación o deprotonación de las moléculas para dar iones monocargados aunque también se observan iones con 2 o más cargas en el caso de proteínas con pesos moleculares superiores a 5000 Da. El peso molecular de las proteínas de mayor tamaño que pueden analizarse mediante esta técnica supera los 400 kDa. El acoplamiento de esta fuente de ionización con analizadores de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) es un método estándar para el análisis de péptidos y proteínas. El método se caracteriza por su robustez, sencillez de manejo y capacidad de automatización, así como por su alta sensibilidad y relativa tolerancia a sales y otras interferencias. Uno de sus principales inconvenientes es que no existen actualmente sistemas que permitan el acoplamiento *on-line*

de esta fuente de ionización con técnicas de separación como la HPLC o la CZE.⁷⁶

En un espectrómetro MALDI-TOF los iones formados en la fuente se aceleran mediante la aplicación de un campo eléctrico. Estos iones adquieren la misma energía cinética durante la aceleración por lo que iones con distinta masa presentan “velocidades de vuelo” distintas, de forma que los iones más pequeños atraviesan más rápidamente el analizador (tubo de vuelo). El tiempo que tarda cada ión en incidir en el detector a la salida del tubo de vuelo depende de su relación masa-carga y de su energía cinética. Considerando constantes la carga y la energía cinética de los iones formados, la medida del tiempo de vuelo permite determinar de forma muy precisa la masa de cada uno de estos iones. Desafortunadamente, los iones en la fuente MALDI no surgen de una fuente puntual por lo que aparecen discrepancias entre las energías cinéticas de iones de la misma masa en el momento de entrar en el tubo de vuelo. Este efecto era el responsable de la baja resolución de los primeros analizadores TOF. Los analizadores modernos han compensado estos problemas recurriendo a estrategias denominadas de extracción retardada y a la utilización de tubos de vuelo provistos de un reflectrón o espejo de iones.³³ Utilizando el reflectrón, los instrumentos MALDI-TOF permiten alcanzar una resolución de 10000 a 15000 (FHWM, a m/z 1300) y caracterizar la masa de los péptidos con un error de 20-100 ppm.⁷⁵⁻⁸¹

Ionización por electrospray (ESI)

El ESI es una técnica de ionización a presión atmosférica en la que una solución de la muestra es nebulizada a la salida de un tubo capilar por la acción de un fuerte campo eléctrico.⁸²⁻⁸³ Las sustancias en solución son introducidas en la fuente a través de un tubo capilar a cuya salida se produce la nebulización gracias a un fuerte campo eléctrico. El ESI forma gotas cargadas que por evaporación llegan a generar iones policargados del analito en fase gaseosa.⁸³

El spray producido está formado por gotas cargadas conteniendo iones de los analitos. Estos iones pueden pasar a fase gaseosa bien a través de procesos de de-solvatación de la gota, bien por desorción directa de iones desde la gota debido a la alta tensión electrostática en el interior de ésta. Este tipo de ionización, que tiene lugar a presión y temperatura ambiental, es extremadamente suave, permitiendo producir no solo iones de la molécula intacta, incluso cuando ésta contiene enlaces lábiles, sino también de complejos formados a través de interacciones no covalentes.⁸⁴

La ionización por ESI produce frecuentemente iones multicargados. El tipo y número de iones producidos mediante ESI reflejan directamente el equilibrio ácido-base existente en la solución. El grado de carga de un determinado ión depende de su estructura (presencia de grupos básicos o ácidos) y del disolvente utilizado. En el caso de un péptido o proteína el número de cargas de cada ión está directamente relacionado con el número de residuos básicos de la molécula (Arg, Lis, His, Pro y el amino terminal). Dado que al aumentar el tamaño de un péptido aumentan también el número de residuos capaces de adquirir carga, la relación masa/carga de los iones producidos a partir de péptidos y proteínas con importantes diferencias de tamaño suelen encontrarse

siempre en el rango de 700 a 2000 de forma prácticamente independiente de la masa . Este fenómeno permite el análisis de iones de compuestos con pesos moleculares muy superiores al límite de barrido de los analizadores comúnmente utilizados con esta técnica. Por ejemplo, el ESI acoplado a un analizador de cuadrupolo permite determinar el peso molecular de péptidos y proteínas de masas superiores a 100 kDa.⁸⁵

Existe además otra dos variante del ESI original que se diferencia en el flujo de solvente que soporta: la denominada fuente de nanospray (nESI) que trabaja a flujos por debajo del microlitro por minuto, permitiendo analizar poco volumen de muestra o analitos que se encuentran a baja concentración en una muestra. La diferencia de diseño más importante entre las fuentes ESI y nESI reside en el diámetro interno del capilar que contiene la muestra: en el ESI el capilar tiene un diámetro interno de 500 μm , mientras que en el nESI se utilizan capilares que a la salida tienen un diámetro interno de 1 o 2 μm .⁸⁶

Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

El análisis por EM mediante las técnicas descritas hasta ahora, provee de información molecular precisa sobre los péptidos o proteínas analizadas, si bien la información sobre su secuencia es muy limitada. Para obtener este tipo de información debe recurrirse a la MS/MS. Mediante esta técnica un ión generado en la fuente de ionización es aislado (ión precursor) y sometido a procesos que producen su fragmentación. La información estructural de la molécula se deriva del análisis de la colección de iones fragmentos producidos. Este procedimiento puede llevarse a cabo de dos formas: separando las

operaciones de selección del precursor y análisis de los fragmentos en el espacio o separándolas en el tiempo.⁸⁷

El primer procedimiento implica la utilización de dos analizadores dispuestos en serie. El ión precursor se selecciona en el primer analizador y se fragmenta mediante procesos de colisión en una cámara de colisión situada entre ambos analizadores. Los iones fragmento se detectan en el segundo analizador. El instrumento más utilizado para esta aplicación ha sido el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo que, como su nombre indica, está formado por tres cuadrupolos colocados consecutivamente: el primero y el tercero (Q1 y Q3 respectivamente) son analizadores y el segundo (Q2) es una cámara de colisión. Otros instrumentos en tándem utilizados, principalmente para la fragmentación de péptidos, son el q-TOF y el TOF-TOF.⁸⁶⁻⁸⁸

El segundo procedimiento (separación en el tiempo) utiliza un único analizador donde tiene lugar la selección de los iones precursores, su fragmentación y el análisis de los fragmentos, pero que lleva a cabo estos procesos en momentos diferentes. Las trampas iónicas y los instrumentos ICR funcionan de esta manera. Este método es muy específico y proporciona información estructural muy valiosa para la secuenciación de péptidos.⁸⁶

Secuenciación de péptidos mediante MS/MS

El patrón de fragmentación de un péptido analizado mediante MS/MS depende de la energía de colisión, de la presión y el tipo de gas de colisión y de la carga del péptido. Este patrón es además característico de la secuencia aminoacídica específica del péptido, de forma que esta última puede deducirse del análisis

del espectro MS/MS. Los péptidos pueden fragmentarse por cualquiera de los enlaces de la cadena lineal generando fragmentos diferentes.⁸⁸

Pueden formarse asimismo fragmentos iónicos derivados de la rotura de dos enlaces denominados fragmentos internos. Los más frecuentes son los iones amonio, que contienen un solo aminoácido. Los iones amonio son característicos de cada aminoácido, siendo normalmente intensos, por lo que permiten un análisis cualitativo de la composición del péptido estudiando la zona de bajo peso molecular del espectro.⁸⁹

La intensidad relativa de los iones fragmentos formados viene determinada por el tipo de aminoácidos presentes en la cadena y por otros parámetros instrumentales como la energía y la presión de colisión.⁸⁷

Algunos péptidos pueden presentar otras características estructurales que afectan directamente el perfil de fragmentación y por tanto la calidad de los espectros obtenidos.⁸⁸

En el caso de péptidos derivados de proteínas conocidas, la identificación de su secuencia no implica necesariamente la determinación directa de la secuencia completa. La determinación de secuencias parciales del péptido o *tags* de secuencia permite la búsqueda de la proteína de origen en las bases de datos. Una vez determinada esta proteína, la secuencia completa del péptido puede derivarse fácilmente a partir del *tag*, la secuencia proteica en el entorno del *tag* y el peso molecular del péptido analizado. De esta forma los péptidos pueden identificarse incluso con espectros donde no toda la información necesaria es aparente.⁸⁹⁻⁹⁰

La modificación química (p.e. derivatización de cisteínas mediante iodoacetamida) e incluyendo ciertas modificaciones postraduccionales de los

aminoácidos puede implicar la formación de nuevos enlaces de baja energía que favorecerán la formación de fragmentos específicos para estas modificaciones en el análisis por MS/MS.⁸⁷⁻⁸⁹ Actualmente, la secuenciación peptídica mediante EM es uno de los procedimientos más utilizados en proteómica para la identificación de proteínas en bases de datos. La identificación se lleva a cabo mediante la secuenciación de uno o más péptidos obtenidos por digestión enzimática de la proteína de interés. La digestión se lleva a cabo comúnmente con una enzima específica como la tripsina, que produce péptidos de digestión con unas características de secuencia que producen espectros de fragmentación informativos; que facilitan la determinación de la secuencia.⁸⁶⁻⁸⁸

II-HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La orina humana es un biofluido, asequible de forma no invasiva, que contiene marcadores biológicos útiles, que reflejan los fenómenos fisiopatológicos del aparato urinario y el metabolismo renal de mediadores sistémicos.

La disfunción crónica del trasplante tiene una etiología multifactorial con un resultado final común consistente en un exceso de matriz extracelular, con sustitución del tejido renal por fibras de colágeno y fibronectina. Como consecuencia del exceso de fibrosis se produce una alteración progresiva de la función renal que conduce de manera irreversible a la insuficiencia renal crónica terminal.

- Variaciones inflamatorias en el post-trasplante pueden condicionar la aparición de la disfunción crónica del trasplante. La detección de estas variaciones podría servir como elemento pronóstico de la evolución del injerto.
- Los cambios moleculares que sucedan en el riñón en el contexto de la disfunción crónica del trasplante, de origen inmunológico o no inmunológico provocan variaciones en la composición proteica de la orina que mediante el análisis del proteoma urinario nos debería permitir una buena correlación con la lesión histológica y un diagnóstico temprano y no invasivo de la disfunción crónica del trasplante.

Objetivo general:

Determinar la utilidad de la proteómica urinaria en el análisis y diagnóstico de la disfunción crónica del trasplante y sus variantes histológicas

Objetivos específicos:

- Analizar el perfil proteómico urinario de la disfunción crónica del trasplante.
- Determinar las diferencias en el proteoma urinario entre sujetos sanos no trasplantados, trasplantados con adecuada función del injerto e individuos con DCI.
- Correlacionar el perfil proteómico de la DCI con los hallazgos de la biopsia del injerto renal según la clasificación Banff.
- Identificar bio-marcadores urinarios para el diagnóstico de la disfunción crónica del trasplante.
- Establecer marcadores diferenciales entre pacientes con IF/TA aislada y pacientes con rechazo crónico activo mediado por anticuerpos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Esta tesis se estructuró como un análisis de la correlación del proteoma urinario con la presencia, severidad y subtipo histológico de la DCI; para valorar la utilidad de este tipo de abordaje metodológico en la búsqueda de biomarcadores urinarios de DCI. Los sujetos incluidos en el estudio fueron agrupados en las condiciones clínico-biológicas antes descritas y el análisis proteómico se realizó en una muestra de orina obtenida de forma prospectiva antes de realizar una biopsia del injerto por indicación clínica.

Sujetos de estudio

Durante el desarrollo de esta tesis se incluyeron un total de 71 individuos, 39 pacientes con DCI y 32 sujetos control. En análisis cualitativo inicial mediante MALDI-TOF se incluyeron 50 individuos y posteriormente se añadieron 21 individuos más en el análisis cuantitativo mediante LC-MS.

Los pacientes estaban divididos en dos grupos según el subtipo histológico diagnosticado: Fibrosis intersticial y atrofia tubular sin evidencia de ninguna etiología específica (**grupo IF/TA**)²⁵ y rechazo crónico activo mediado por anticuerpos definido por la detección sérica de anticuerpos donante específicos y la presencia de los siguientes cambios histológicos: glomerulopatía del trasplante, fibrosis intersticial y atrofia tubular con o sin pérdida de capilares peritubulares, engrosamiento fibroso de la íntima arterial sin duplicación de la lámina elástica y la presencia de C4d positivo en capilares peritubulares (**grupo CAAR**).²⁵

Los controles estaban divididos en dos grupos: 1) **trasplantados renales con función estable** que fueron receptores de un primer injerto proveniente de un donante vivo, con función y biopsia renal normal en el tercer mes post-trasplante. 2) **Individuos sanos**: voluntarios con presión arterial normal (sistólica < 130 mmHg y diastólica < 80 mmHg), sin historia de diabetes ni enfermedad cardiovascular.

Todos los individuos trasplantados estudiados en esta tesis recibían tratamiento inmunosupresor con los siguientes fármacos: tacrolimus, micofenolato y esteroides.

El estudio fue aprobado por el comité ético del hospital Clinic de Barcelona y todos los individuos incluidos firmaron un consentimiento informado aprobando la recolección y análisis de sus respectivas muestras de orina.

En los artículos presentados en esta tesis existe una descripción detallada de las características demográficas de los grupos de individuos incluidos.

Histopatología

Las biopsias de injerto renal se obtuvieron mediante punción eco-dirigida y por indicación clínica. Se prepararon secciones de parafina teñidas con hematoxilina eosina, ácido peryódico-Schiff-plata metenamina. Estas preparaciones fueron analizadas por un patólogo y siguiendo los criterios de la clasificación de Banff. El diagnóstico de glomerulopatía del trasplante se basó en hallazgo mediante microscopia óptica de dobles contornos de la membrana basal glomerular apoyado por la presencia de IgM y/o C3 mesangial o de hallazgos negativos en la inmunofluorescencia. La presencia de capilaritis peritubular fue estimada de acuerdo con los criterios cuantitativos de la última actualización de la clasificación de Banff.²⁵ La tinción de C4d fue realizada en

todas las biopsias, usando tejido congelado. C4d Murino monoclonal anti-humano 100 IL (Quidel Corporation, San Diego, CA), y posteriormente antisuero fluorescente (CyTM2-conjugated AffiniPure Goat Antimouse IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA) fueron añadidos al tejido congelado.

Análisis de anticuerpos anti-HLA

Para esta tesis se recolectó suero del receptor antes de realizar la biopsia del injerto, con el objetivo de descartar la presencia de anticuerpos anti HLA clase I y II mediante FlowPRA®. Si eran positivos se determinaba la especificidad del anticuerpo con FlowPRA® específico de clase I o II o con FlowPRA® Single Antigen I – II. (One Lambda Canoga Park, CA). Las cuentas fueron analizadas en un citómetro BD FACSCalibur™.

Obtención y purificación de la muestra de orina

Se utilizaron 50 ml de orina obtenida de la segunda micción matutina, justo antes de practicar biopsia del injerto renal. Tras añadir una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche), se filtró, centrifugó y rápidamente se almacenó y conservó a -80° hasta el momento del análisis.

Las muestras de orina fueron concentradas y los polipéptidos separados de sales inorgánicas utilizando el siguiente protocolo de extracción en fase sólida con cartuchos HLB Oasis 94226 (Waters, Milford, MA) como fase estacionaria.

- A) Una vez descongelada la orina en hielo se añade TFA 0.5% en proporción 1/2 con el volumen de muestra hasta obtener un pH 3 en la mezcla. Posteriormente se pasa la muestra resultante por una membrana de 0.45 μm .
- B) Extracción en fase sólida (SPE): Utilizamos cartuchos con HLB(Oasis, Waters) de 60 mg. Acondicionamos con ACN 100% 20 ml, equilibramos con TFA 0.1%/ACN 5% 20 ml, y una vez preparado el cartucho se carga la muestra a un flujo de 1 ml/min. El siguiente paso es lavar en dos fases, la primera con TFA 0.1%/ACN 10% 20 ml, la segunda con TFA 0.1%/ACN 30% 1 ml. Finalmente se hace la elusión con 2 ml de ACN 60%/TFA 0.1% y se recoge en tubo cónico de 4 ml y se almacena a -80 C.

Técnicas de espectrometría de masas utilizadas

MALDI

Utilizamos un espectrómetro tipo Voyager-DE PRO TM Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, Foster City, CA) en el que la ionización se logró combinando el conjunto de péptidos de la muestra purificada con compuestos orgánicos (matriz) para inducir cristalización, y posteriormente se sometió a un pulso de láser para vaporizar los péptidos. Los datos fueron obtenidos con modo lineal y los ajustes del instrumento fueron: voltaje de aceleración de 25 kV, 91% voltage grid , 0.05% voltaje guía , tiempo de retardo de 220 nsec, y tamaño bin de 2 nsec. Las muestras se cargaron en placa de MALDI y los espectros se obtuvieron de forma aleatoria (3 tomas de 150

disparos cada una) de cada replicado; los standards de calibración interna fueron: Insulina bovina 0.5 pmol/uL, thioredoxina de *Escherichia coli* 2.75 pmol/uL y apomioglobina de caballo 4 pmol/uL (standard 3 de Applied Biosystems). El ruido químico presente en cada espectro fue estimado para determinar la mínima intensidad medida en ventanas de valor sucesivo de 100 m/z. Se definió una función para valores mínimos aptos como base de referencia y se restó del espectro. Los datos fueron analizados en el rango de masa/carga 1.0–20 kDa, se obtuvo la media aritmética de los tres espectros de cada replicado y con el software Data Explorer 4.3 se detectaron los picos del espectro promedio.

Para realizar la comparación de los espectros de las diferentes muestras se alinearon con un algoritmo de agrupación jerarquizado.⁹¹

Posteriormente se practico procesamiento y análisis informático de los espectros obtenidos utilizando el software: MeV package in the TM4.⁹²

Finalmente se realizó análisis estadístico diferencial con el software Significance analysis of microarrays (SAM).⁹³

Los iones proteicos diferenciales fueron también evaluados con análisis de regresión logística utilizando análisis discriminante y un modelo de regresión logística para calcular el valor predictivo para cada muestra, permitiendo construir una curva ROC basada en los valores obtenidos.⁹⁴

LC/MS/MS

La mezcla de péptidos desecada se disolvió en 10 µL of 0.1% TFA / 2% ACN y el 10% de está solución fue analizado en un sistema de LC/MS/MS compuesto por un cromatógrafo líquido con nanoflujo ultra-alta presión (Acquity,

Waters/Micromass) conectado en línea con un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (Q-TOF Premier mass spectrometer) (Waters/Micromass) equipado con una fuente de nano-electro spray. Para fraccionar la muestra se utilizó una columna BEH 100 μm x 100 mm (Waters/Micromass) a un flujo de 400 nL/min con una retropresión de funcionamiento aproximada de 3,000 psi. El gradiente utilizado fue desde 2%B a 30 %B en 30 minutos seguido de 5 min de lavado con 80% de B y 7 min de equilibrado a 2 % de B. El Solvente A fue ácido fórmico 0.1% en agua (Optigrade, LGC, UK) y el solvente B era ácido fórmico 0.1% en ACN (Optigrade, LGC, UK).

Cuantificación: Las listas de los iones seleccionados para MS/MS fueron procesados en PESCAL, un programa para la automatización y análisis de datos de LC-MS.⁹⁵ Este programa usa la m/z y el tiempo de retención de los iones para extraer cromatogramas de los espectros corridos de LC-MS de muestras de orina individuales. Las ventanas de extracción de los cromatogramas fueron 25 ppm y 2 min para m/z y tiempo de retención respectivamente. Los valores de intensidad obtenidos (área y altura del pico) de los cromatogramas extraídos eran extrapolados a un archivo excel para normalización y tratamiento estadístico que incluyo normalización de los valores con el contenido de creatinina de la respectiva muestra de orina.

Para realizar análisis de aglomeración no jerarquerizado se utilizó el software Eisein⁹⁶ y para visualizar los resultados el software TreeView Eisein.

La prueba no paramétrico Kuskal-Wallis fue utilizada para inferir la significancia estadística de los resultados cuando se comparaban más de dos grupos de

muestras y la prueba de Mann-Whitney se aplicó para comparaciones de dos grupos de muestras. (GraphPad Prism 4.03).

La identidad de los péptidos detectados en la espectrometría fue determinada mediante búsqueda cruzada en la base de datos Swissprot version 5.1.6 restringida para entradas de humanos (15,720 secuencias) utilizando MASCOT motor de búsqueda. Durante el proceso de indagación se restringió a 50 ppm y 100 ppm para iones parentales y fragmentos, respectivamente. No se aplicaron restricciones por enzima y los hallazgos fueron considerados significativos cuando estaban por encima del umbral estadístico y por lo menos dos péptidos acompañaban la entrada de una proteína. También se utilizaron las bases de datos para MS-Tag and MS-Homology (Protein prospector v 5.1.8 Basic) against NCBI (2008.11.25) y SwissProt (2008.06.10) para analizar los espectros seleccionados.

LC-MRM-MS/MS (Multiple reaction monitoring)

Utilizando el sistema Q-TOF Premier/nanoUPLC descrito antes se validaron los iones diferenciales mediante un experimento de MRM. El análisis se hizo con un gradiente de 10 min. (2% a 35% B en 10 minutos). Se monitorizaron 5 iones simultáneamente (m/z 610.7, 638.0, 642.6, 645.6, 1096.8) en capturas alternativas y un ritmo de 150 ms/scan.

IV. RESULTADOS

Primer trabajo

Urine proteomics to detect biomarkers for chronic allograft dysfunction. J Am Soc Nephrol. 2009 Feb; 20(2):428-35.

Urine Proteomics to Detect Biomarkers for Chronic Allograft Dysfunction

Luís F. Quintana,^{*†} Amanda Solé-Gonzalez,[†] Susana G. Kalko,[‡] Elisenda Bañon-Maneus,[†] Manel Solé,[§] Fritz Diekmann,^{||} Alex Gutierrez-Dalmau,[†] Joaquin Abian,[¶] and Josep M. Campistol^{*†}

^{*}Servicio de Nefrología y Trasplante renal, [†]Laboratorio Experimental de Nefrología y Trasplante renal, [‡]Unidad de Bioinformática, [§]Servicio Anatomía Patológica, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universidad de Barcelona, and [¶]Laboratorio de Proteómica Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)/Universidad Autónoma, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona/CSIC-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain; and ^{||}Department of Nephrology, Charité Campus Mitte, Berlin, Germany

ABSTRACT

Despite optimal immunosuppressive therapy, more than 50% of kidney transplants fail because of chronic allograft dysfunction. A noninvasive means to diagnose chronic allograft dysfunction may allow earlier interventions that could improve graft half-life. In this proof-of-concept study, we used mass spectrometry to analyze differences in the urinary polypeptide patterns of 32 patients with chronic allograft dysfunction (14 with pure interstitial fibrosis and tubular atrophy and 18 with chronic active antibody-mediated rejection) and 18 control subjects (eight stable recipients and 10 healthy control subjects). Unsupervised hierarchical clustering showed good segregation of samples in groups corresponding mainly to the four biomedical conditions. Moreover, the composition of the proteome of the pure interstitial fibrosis and tubular atrophy group differed from that of the chronic active antibody-mediated rejection group, and an independent validation set confirmed these results. The 14 protein ions that best discriminated between these two groups correctly identified 100% of the patients with pure interstitial fibrosis and tubular atrophy and 100% of the patients with chronic active antibody-mediated rejection. In summary, this study establishes a pattern for two histologic lesions associated with distinct graft outcomes and constitutes a first step to designing a specific, noninvasive diagnostic tool for chronic allograft dysfunction.

J Am Soc Nephrol 20: 428–435, 2009. doi: 10.1681/ASN.2007101137

During the past three decades, the incidence and prevalence of ESRD has increased each year all over the world.¹ Kidney transplantation is the treatment of choice for ESRD because it prolongs survival,² improves quality of life, and is less costly than dialysis³; however, despite these improvements, a substantial proportion of grafts develop progressive dysfunction and fail within a decade, even with the use of appropriate dosages of immunosuppressive drugs to prevent acute rejection.⁴ Chronic allograft dysfunction (CAD) causes more than 50% of graft losses.^{5–7} Although patients can return to dialysis after transplant failure, loss of a functioning graft is

associated with a three-fold increase in the risk for death,^{2,8,9} a substantial decrease in quality of life in survivors, and a four-fold increase in cost.^{1,3}

The decline in function, often associated with hypertension and proteinuria, constitutes a clinical

Received October 23, 2007. Accepted August 27, 2008.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Dr. Luís F. Quintana, Servicio de Nefrología y Trasplante renal, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Phone and Fax: 34-3-2275444; E-mail: lfquinta@clinic.ub.es

Copyright © 2009 by the American Society of Nephrology

syndrome that has been called chronic allograft nephropathy (CAN). The histopathologic hallmarks of these patients are chronic interstitial fibrosis, tubular atrophy, vascular occlusive changes, and glomerulosclerosis, usually evaluated by the Banff working classification.¹⁰ Major outcomes discussed at the last Banff Conference included the elimination of the non-specific term CAN and recognition of the entity “chronic active antibody-mediated rejection” (CAAR).¹¹ The rationale for this update was the improper use of “CAN” as a generic term for all causes of chronic renal allograft dysfunction with interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA), which hampers accurate diagnosis and appropriate therapy, and increasing recognition of the role of alloantibody in chronic renal allograft deterioration and the corresponding histologic changes, making the identification of an antibody-mediated component of chronic rejection feasible.¹¹

Effective strategies to prevent renal function deterioration should focus on the early detection and treatment of patients who develop CAD. In addition to elevated serum creatinine, usually associated with proteinuria and arterial hypertension, more specific and sensitive markers are needed to identify high-risk patients or initial lesions without any changes in serum creatinine or proteinuria.^{5,11}

New analytic tools that allow rapid screening and accurate protein identification in body fluids are now emerging within the field of proteomic science. High-throughput mass spectrometry (MS) methods allow simultaneous detection of a large number of proteins in a large set of biologic tissues or samples. Protein fingerprinting MS methods using modern matrix-assisted laser desorption/ionization-time of-flight MS (MALDI-MS) instrumentation can detect hundreds of peak signals that, as a whole, could be considered a reflex of the body’s physiologic status.¹² To date, MALDI-MS has been successfully used to detect patterns of substantial overexpression of proteins in cancer cells.^{13–15} Urine seems to be an ideal source of potential biomarkers, and urine proteomic approaches have been used in numerous attempts to define biomarkers for a variety of nephro-urologic disorders.^{16–18} The aim of this study was to evaluate whether chromatography by solid-phase extraction coupled to MS would differentiate urinary polypeptide patterns in patients with pure IF/TA, patients with CAAR, and two control groups: Healthy individuals and stable renal transplant recipients.

RESULTS

Clinical and Histologic Characteristics of Patients with CAD

The analysis included 50 individuals: 32 patients with CAD (eight in training set and six in validation set with IF/TA with no other cause and 10 in training set and eight in validation set with CAAR) and 18 control subjects (10 healthy individuals and eight stable renal transplant recipients). Table 1 shows the baseline characteristic of patients with CAD and control subjects.

There was no evidence of CAAR or transplant glomerulopathy (TG), and C4d was negative in all patients with pure IF/TA (G1). Mean glomerular double contour (CG) score was 1.89, and C4d was positive in all patients in the CAAR group (G2). Evidence of chronic active T cell-mediated rejection was excluded in all samples from this group. Table 2 summarizes Banff scores in the IF/TA and CAAR groups. Table 3 shows the HLA of both recipients and donors and the status of circulating donor-specific anti-HLA antibodies in patients with CAAR and with the HLA analysis in the prebiopsy period. All patients had available HLA matching data; none was HLA identical. The mean HLA-A-B-DR mismatches was 4,16 (minimum 2, maximum 6), and 100% of patients with CAAR had donor-specific antibody (DSA) by FLOWPRA Specific Antibody Detection Test (One Lambda, Canoga Park, CA).

Urinary Proteome of Healthy Individuals Compared with Those of Stable Transplant Recipients and Patients with CAD

We found some differences between control subjects and patients with CAD. Patients with CAD (IF/TA and CAAR) always had had peak clusters in three regions corresponding to mass/charge (*m/z*) values of 2628 to 2922, 4307 to 4799, and 8303 to 8850, whereas the healthy urine protein profile had no peak clusters in these *m/z* regions. All urine samples from healthy individuals showed a peak *m/z* of 9754. Subsequently, an informatics analysis was performed in a blind and systematic manner as cases were added. (All data containing the peak intensities and molecular weights in all patients are provided online as supplemental information.)

Unsupervised hierarchical clustering using the 2000 proteins with the largest variability in the whole set of spectrums in

Table 1. Clinical characteristic of study cohorts and controls groups^a

Characteristic	IF/TA Group (n = 14)		CAAR Group (n = 18)		Stable Renal Transplant Recipients (n = 8)	Healthy Control Subjects (n = 10)
	Training Set (n = 8)	Validation Set (n = 6)	Training Set (n = 10)	Validation Set (n = 8)		
Age (yr)	51.00 ± 10.69	49.90 ± 12.09	47.22 ± 17.07 ^b	51.00 ± 15.20	36.20 ± 8.00	43.00 ± 10.00
Creatinine (mg/dl)	3.20 ± 1.68	3.10 ± 1.48	2.98 ± 1.64 ^b	2.80 ± 0.82	1.08 ± 0.30	0.91 ± 0.30
Proteinuria (g/24 h)	2.67 ± 2.90	2.63 ± 2.70	3.11 ± 3.33 ^b	3.29 ± 2.96	0.20 ± 0.05	0.11 ± 0.02
GFR (ml/min per 1.73 m ²)	28.88 ± 17.65	29.78 ± 15.60	33.44 ± 12.05 ^b	27.90 ± 10.10	82.22 ± 4.00	110.00 ± 10.00

^aData are means ± SD.

^bT test NS between IF/TA and CAAR groups.

Table 2. Histopathology of allograft biopsies^a

Parameter	IF/TA Group		CAAR Group	
	Training Set (n = 8)	Validation Set (n = 6)	Training Set (n = 10)	Validation Set (n = 8)
Glomerular double contours (cg)	0	0	1.89 ± 0.70 ^b	2.11 ± 0.80
Interstitial fibrosis (ci)	1.88 ± 0.90	1.95 ± 0.60	2.11 ± 0.70 ^c	2.05 ± 0.60
Tubular atrophy (ct)	1.88 ± 0.90	1.95 ± 0.60	2.11 ± 0.70 ^c	2.05 ± 0.60
Arterial fibrous intimal thickening (cv)	0.88 ± 0.60	1.10 ± 1.00	1.56 ± 1.00 ^b	1.30 ± 0.90
Hyaline arteriolar thickening (ah)	0.75 ± 1.10	0.98 ± 0.80	1.56 ± 1.10 ^c	1.10 ± 1.20
Peritubular capillaritis (ptc)	0.75 ± 0.40	1.10 ± 0.50	1.33 ± 0.70 ^c	1.20 ± 0.80

^aData are means ± SD.

^bT test significant (P < 0.05).

^cT test NS.

Table 3. HLA of both recipients and donors and the status of circulating donor-specific anti-HLA antibodies in patients with CAAR and with the HLA analysis in the peribiopsy period^a

HLA Recipient	HLA Donor	DSA
A 3, 35. B 7, 18. DR 3, 7, 51	A 2, 31. B 7, 37. DR 3, 7	A 2 ^b
A 23, 29. B 8, 44. DR 1, 10	A 23. B 18, 58. DR 3, 10	B 18 ^b
A 2. B 44, 60. DR 1, 11	A 31. B 44, 60. DR 3, 11	A 31 ^b
A 2, 23. B 35, 44. DR 4, 7, 53	A 2, 23. B 44, 60. DR 7, 13	A 23
A 1, 25. B 18. DR 103	A 26, 34. B 14. DR 1–15	A 26
A 24, 30. B 18, 62. DR 17, 4, 52	A 2, 32. B 7, 60. DR 1, 11	A 2
A 1, 3. B 8, 27. DRb1 4, 13	A 29, 68. B 8, 13. DRb1 4, 13	B 13
A 1, 9. B 44, 55. DR 7, 8	A 2, 29. B 13, 18. DR 1, 3	A 2
A 1, 3. B 7, 38. DRb1 1, 10	A 24, 31. B 39, 45. DR 4–10	A 31
A 2, 23. B 7, 44. DRb1 15, 13	A 2, B 7, 44. DR 13, 15	B 44
A 1, 26. B 8, 35. DRb1 13, 14	A 1, 3. B 8, 35. DR 3, 4	B 8
A 2, 29. B 7, 44. DRb1 7, 15	A 3, 29. B 7, 44. DR 2	B 44
A 2, 24. B 18, 44. DRb1 4, 11	A 3, 28. B 7, 18. DR 15, 11	B 18
A 1, 3. B 8, 27. DRb1 3, 10	A 3, 80. B 8, 58. DR 3, 8	A 3 ^b
A 23, 31. B 51, 44. DR 5, 7	A 23, 30. B 42, 49. DR 11, 17	B 42 ^b
A 2. B 44, 60. DR 1, 6, 52	A 2, 28. B 35, 49. DR 1, 3	A 28 ^b
A 2, B 44, 62. DRb1 11, 13	A 1, 3. B 35, 37. DR 7.	B 35 ^b
A 2, 24. B 8. DR 3, 11	A 2. B 45. DR 3, 11	A 2 ^b

^aThe cases with positive panel-reactive antibodies were tested for HLA antibody specificities using FlowPRA Specific Antibody Detection Test (One Lambda).

^bPatients with CAAR from independent validation set.

the m/z ranging from 1000 to 20000 showed good segregation of samples in groups corresponding mainly to the four biomedical conditions: Healthy individuals and stable renal transplant recipients (control groups) and patients with IF/TA and CAAR (the two CAD groups; Figure 1). Note that some confounding occurred between some individuals with IF/TA and CAAR and between some healthy individuals and individuals with a stable renal transplant, a predictable result given the slight clinical overlap between groups.

Differential Expression Analysis of Patients with CAD

In the unsupervised cluster analysis, patients with CAAR were grouped together, separately from patients with IF/TA. These results suggest that the composition of the urine proteome of pure IF/TA is subtly different from that of the CAAR urine proteome. Subsequently, we tried to determine the differences

in the urine proteomic profile among patients with pure IF/TA and those with CAAR.

Differential expression analysis in a first set of samples (training set) showed statistically significant differences between the IF/TA and CAAR groups; these differences identified possible biomarkers that might confidently be used to distinguish between these two entities. Using the significance analysis of microarrays (SAM)¹⁹ module in MeV,²⁰ we reported 366 m/z values with fold change (CAAR and IF/TA) <0.5 and a significance of q < 0.01 (q = false discovery rate). Mass proteins with fold change <0.5 in the m/z range 2850 to 3050 are shown in Figure 2.

To validate protein signature obtained in the training set, we considered an independent set of samples (validation set) from IF/TA and CAAR groups, equivalent to the training set. Unsupervised clustering of the validation set using the 366 m/z obtained in the previous SAM analysis on the training set shows very good segregation of this new set in the two groups (Figure 3).

Furthermore, we analyzed the 366 selected protein ions using discriminant analysis. The protein ions that best discriminated between the two groups were 1529.22, 1529.45, 1539.8, 1540.03, 1541.87, 1542.1, 1574.79, 1575.02, 1575.25, 1575.48, 1575.72, 1587.86, 1657.4, and 6146.92, resulting in correct identification of 100% (eight of eight) of the pure IF/TA group and 100% (10 of 10) of the CAAR group. Logistic regression (LR) analysis resulted in selection of 1539.8, 1540.03, 1542.1, 1575.48, 1587.86, and 1657.4. A receiver operating characteristic curve constructed from the logistic regression scores gave a high area under the curve value of 1.0 (Figure 4). This distinct protein signature is a suitable model for further identification of biomarker candidates.

DISCUSSION

Like surface enhanced laser desorption/ionization technology, direct polypeptide profiling by solid-phase extraction and

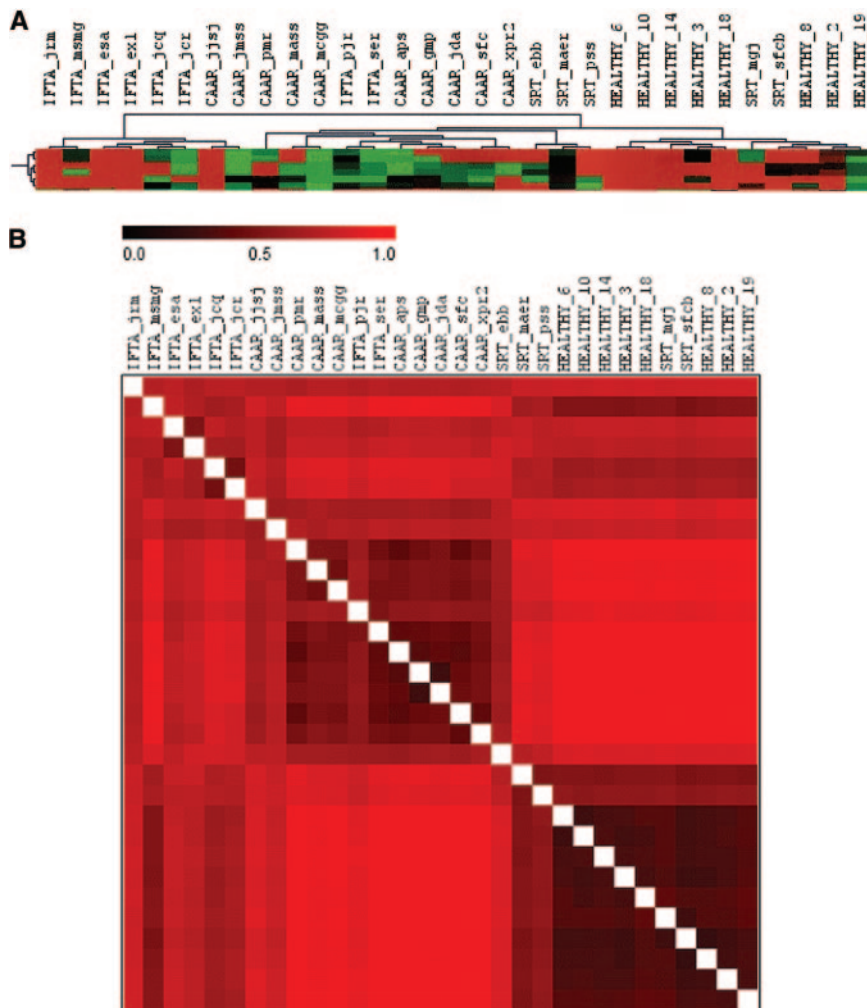


Figure 1. (A) Detail of unsupervised hierarchical clustering using the 2000 m/z features with the largest variability in the entire set of samples (HCL* module of MeV package).²⁴ (B) Matrix representation of the distances (inverse of the similarity) between samples, using the same features as those used in A (GDM module of MeV package).

MALDI-MS reduces the complexity of a sample by selective adsorption of proteins to an active surface and is a relatively simple proteomic approach that allows rapid differential diagnosis of patients and information transfer between the laboratory and the clinical context.¹⁸ The processes that result in CAD are poorly understood. Although determination of organ failure often relies on measurable physiologic parameters, the early stages of CAD are difficult to diagnose. Detection requires invasive procedures to obtain graft biopsies for histologic evaluation.⁵ To our knowledge, this is the first preliminary report on this broad-based, unbiased, noninvasive proteomic and bioinformatics approach as a means to design a noninvasive diagnostic tool for CAD.

The large quantity of protein data generated requires complementary bioinformatics tools to identify differential patterns of value, and a mathematical model was used to distinguish between the overlapping sets of results.^{21,22} To avoid

biases and misinterpretation between the CAAR and IF/TA groups, the samples analyzed were taken from patients with similar follow-up after transplantation, the same immunosuppressive treatment, similar renal function, and similar Banff score on IF/TA. The only difference between the two groups was the presence of histologic markers of CAAR and HLA DSA in the CAAR group. Allergic drug reactions, systemic or intragraft infections, and other inflammatory processes were reasonably excluded.

Initially, comparative bioinformatics urine proteomic analysis detected differences among healthy individuals, stable transplant recipients, and patients with IF/TA and CAAR, showing an excellent clinical correlation. Importantly, the presence of IF/TA is another criterion required for a diagnosis of CAAR, and the absence of differences in the IF/TA scores of the two groups is a plausible explanation for the finding that both groups (two CAAR samples were interchangeable with two IF/TA samples) share some mass values. The same phenomenon occurred in two stable renal transplant samples and two samples from healthy individuals, indicating that these groups have some urine proteins in common.

When we analyzed our two groups of patients with CAD in greater detail, the differential expression analysis confirmed differences between patients with pure IF/TA and patients with IF/TA plus CAAR. The mass range analysis highlighted these differences, whereas comparison with traditional markers (creatinine and proteinuria)^{5,11} of CAD demonstrated that our markers had discriminatory power. Moreover, the independent and equivalent validation set confirms the results from the training set.

The presence of IF/TA in protocol renal allograft biopsies is an independent predictor of graft survival.^{23,24} Recently, IF/TA associated with transplant vasculopathy,²⁵ subclinical rejection, and TG was shown to be associated with a poorer outcome and prognosis than IF/TA without additional lesions (pure IF/TA).^{26,27} Although histologic lesions predict graft survival, their accuracy has been poorly characterized. Preliminary data suggest that their predictive value in graft survival is at least not inferior to that of acute rejection or renal function. In addition, quantitative evaluation of histologic lesions has been performed in an attempt to provide a better surrogate marker for graft half-life. Both morphometry and image analysis have been used to quantify interstitial fibrosis and transplant vasculopathy, but neither of these parameters has been

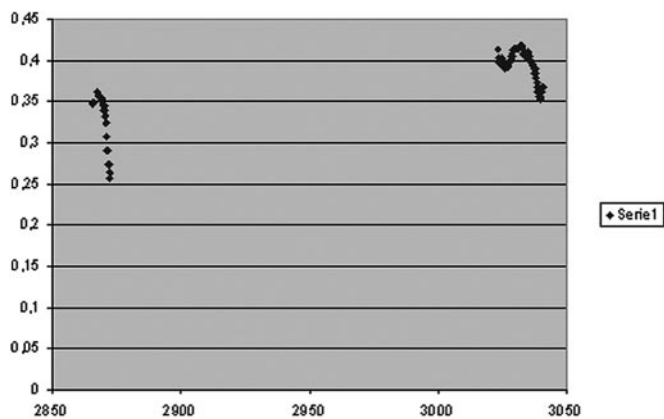


Figure 2. Distribution of fold change in the m/z range 2850 to 3050. Significant underexpressed features in the range of 2850 to 3050 m/z showing a mean value (CAAR) group/mean value (IF/TA group) ≤ 0.5 . This condition normally adds biologic relevance to statistical results.

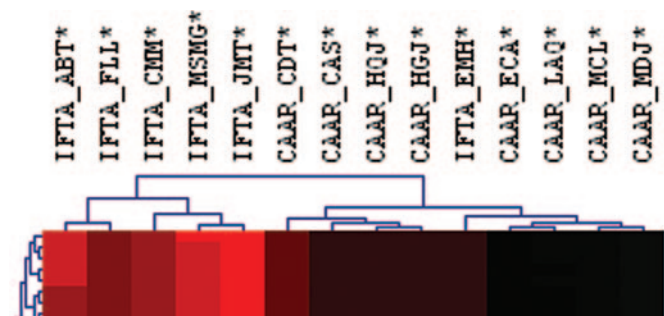


Figure 3. Detail of unsupervised hierarchical clustering on the new validation samples, using the 366 features statistically differentiated in the SAM¹⁹ analysis on training samples (HCL* module of Mev Package).²⁴

properly validated. An alternative strategy to increase the predictive value of protocol biopsies in graft outcome was validation with composite end points containing histologic, clinical, biologic, and analytical parameters.²⁸

This study reveals a differential link between specific clinical factors, histologic findings, and urine proteome among patients with CAAR and those with IF/TA without additional lesions. Despite the limited number of patients analyzed, the unsupervised cluster analysis differentiated between patients with pure IF/TA and those with CAAR (IF/TA + CAAR), supporting the importance of the recent update of the Banff working classification of CAD.

In view of the complex relationship among clinical and biologic CAD factors and among early histopathologic changes and graft outcome, the search for a urine biomarker panel to identify the various causes of CAD seems absolutely necessary to improve long-term graft survival. Moreover, the different urine protein excretion patterns in patients with pure IF/TA versus those with CAAR detected in this study will support the identification of different urine biomarkers for these two histologic lesions with distinct outcomes; notably, the CAD pat-

ROC Curve

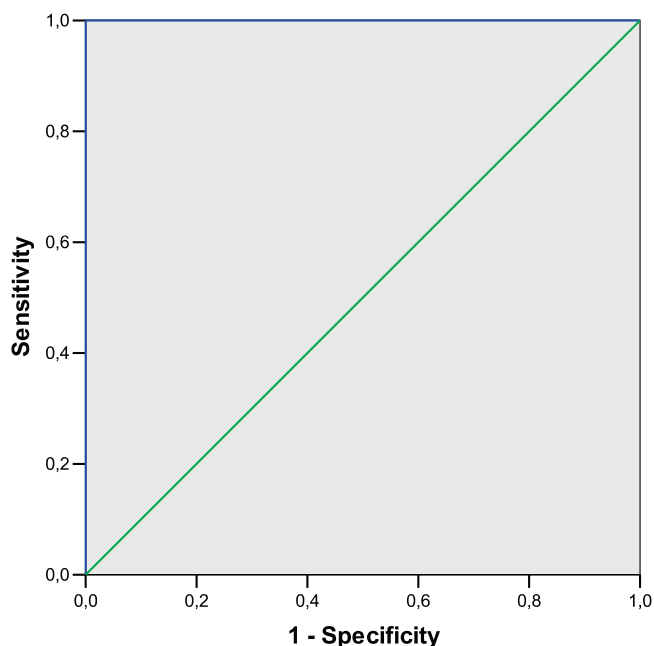


Figure 4. Receiver operating characteristic (ROC) curve for 1539.8, 1540.03, 1542.1, 1575.48, 1587.86, and 1657.4 protein ions were generated using logistic regression scores, with an area under the curve of 1.0.

tern had peak clusters in three regions with high linkage, which could be used in investigation of urinary markers of graft fibrosis. The combination of protocol graft biopsies with simultaneous proteomic analyses at different times after renal transplantation could provide more accurate information on the exact mechanisms involved in the development of CAD. This information could be very helpful not only for an early diagnosis of CAD but also in the treatment and prevention of the leading cause of graft loss.

Additional studies including a larger and more diverse transplant recipient population are required to confirm our data. Reproduction of these patterns in future studies would represent a step forward in identifying each protein and in translating this relatively intricate procedure into a biochemical test of clinical utility.

CONCISE METHODS

Study Cohorts

Fifty individuals were included in the study: 32 patients with clinical and histopathologic characterization of CAD and 18 control subjects. The patients were divided in two groups: (1) 14 patients (nine men and five women) with IF/TA and no evidence of any specific cause (IF/TA group) and (2) 18 patients (12 men and six women) with CAAR defined by morphologic features including TG and IF/TA with or without peritubular capillary loss, and fibrous intimal thickening in arteries without duplication of the internal elastica, diffuse C4d

deposition in peritubular capillaries (PTC), and the presence of DSA (CAAR group).

All transplant recipients received immunosuppressive treatment with a calcineurin inhibitor, mycophenolate mofetil, and prednisone. There were no significant differences between the IF/TA and CAAR groups with respect to age, gender, diabetes duration, arterial BP, body mass index, and GFR (Table 1).

The control subjects were divided in two groups: (1) Stable renal transplant recipients, who were eight live-donor recipients of a first renal graft at the end of the first month after surgery with normal pretransplantation biopsy and after immunosuppressive treatment with tacrolimus, mycophenolate mofetil, and prednisone (mean age 36.2 ± 8.0 , mean serum creatinine 1.08 ± 0.30 mg/dl, and mean proteinuria 205.2 ± 50.0 mg/d) and (2) healthy control subjects, who were 10 volunteers with normal BP (systolic BP <130 mmHg and diastolic BP <80 mmHg) and no history of diabetes, ischemic heart disease, stroke, or peripheral vascular disease (mean age 43 ± 10 yr; seven men and three women, mean creatinine 0.91 ± 0.30 mg/dl, GFR 110 ± 10 ml/min, mean microalbuminuria/creatinuria 4 ± 1 mg/g, mean proteinuria/creatinuria 39 ± 6 mg/g). The study was approved by the institutional review board at the Hospital Clinic in Barcelona, and both patients and control subjects gave informed consent for the collection and analysis of their urine.

Histopathology

Transplant biopsies consisted of two cores obtained with 18-gauge needles using ultrasound guidance because of clinical indication. Paraffin sections were prepared and stained with hematoxylin-eosin, trichrome, periodic acid-Schiff, and periodic acid-Schiff–methenamine silver.

The biopsies were analyzed and were scored according to the Banff classification by a pathologist who was blinded to the results of molecular studies.^{10,29} TG was diagnosed by light microscopy on the basis of double contours of glomerular basement membranes¹⁰ and was supported by immunofluorescence studies, which showed mesangial IgM and/or C3 or negative immunofluorescence findings. Peritubular capillaritis in TG biopsies was graded according to the quantitative criteria of the last Banff update.¹¹ C4d staining was done in all biopsies using frozen tissue. Murine monoclonal anti-human C4d 100 IL (Quidel Corp., San Diego, CA), followed by fluorescence antisera (CyTM2-conjugated AffiniPure Goat Antimouse IgG; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) were added to the frozen sections. Linear staining of PTC for C4d with mild intensity or above was graded as diffuse (estimated $\geq 50\%$ of sampled capillaries) or focal (1 to 50% of sampled capillaries) positive.³⁰ Biopsies from patients with previously documented diffuse positive C4d in PTC served as positive controls.

Anti-HLA Antibody Analysis

Recipient sera taken in the prebiopsy period were screened for HLA class I and class II antibodies by FlowPRA. When positive, antibody specificities were determined by FlowPRA Specific class I and or II and or FlowPRA Single Antigen I and II beads (One Lambda). Beads were analyzed on a BD FACSCalibur cytometer. Antibody specificities to HLA-A, B, DRb1, DRb3, DRb4, DRb5, DQb1 were evaluated.

Sample Preparation and Purification

Fifty milliliters of early morning urine was collected immediately before renal biopsy, adding protease inhibitor cocktail (Complete Mini; Roche, Mannheim, Germany); rapidly frozen in dry ice; and stored at -80°C until analyzed. Urine samples were concentrated and separated from organic salts by solid-phase extraction using a reverse-phase HLB Oasis 94226 (Waters, Milford, MA) as the stationary phase and according to the following protocol: Conditioning in 10 ml of 100% acetonitrile (ACN), equilibration in 10 ml of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)/5% ACN, loading of sample (acidified with 0.1% TFA at pH 3 and final concentration of 5% ACN), washing with 10 ml 0.1% TFA/5% CAN, and elution with 2 ml of 0.1% TFA/60% ACN.

Each sample was applied and dried on an uncoated MALDI target plate using the sandwich technique (1 μl of sample plus 2 μl of matrix). A saturated solution of 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapinic acid; Sigma, St. Louis, MO) in ACN/H₂O/TFA 50/50/0.3 was used as matrix. Ten spots were prepared and analyzed per sample.

Mass Spectrometer Data Acquisition

Mass spectra were acquired with a Voyager-DE PRO TM Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, Foster City, CA), and data were obtained by using the linear acquisition mode under delayed extraction conditions. Instrument settings were an accelerating voltage of 25 kV, 91% grid voltage, 0.05% guidewire voltage, delay time of 220 ns, and bin size of 2 ns. Three spectra (three acquisitions of 150 shots each) were acquired for each replicate. Internal calibration standards were insulin bovine 0.5 pmol/ μl , thioredoxin from *Escherichia coli* 2.75 pmol/ μl , and apomyoglobin from horse 4 pmol/ μl (standard mixture 3 from Applied Biosystems). Deposition of the samples on the MALDI target and mass spectra acquisition were performed randomly.

Data Analysis

Baseline Correction.

The chemical noise present in each spectrum was estimated by determining the minimal measured intensity value in successive 100 m/z windows. A function fit to these minima by least squares was defined as baseline and subtracted from the spectrum.

Binning of Peaks.

Data were analyzed for the molecular weight range of 1.0 to 20 kD. The three spectra from each replicate were averaged arithmetically, and automated peak detection was carried out on these averaged spectra in Data Explorer 4.3 software, which determines the centroid mass, height for the 50th percentile of the lower and upper boundary of the peak, and area and signal-to-noise ratio for each peak (signal-to-noise threshold of 2, a 5-kD for computing noise and 50% centroid to define peak width).

Preprocessing of MS Data

For the comparison of the peaks included in different spectra, peak alignment was performed with an agglomerative hierarchical clustering algorithm.²¹ The algorithm initially creates as many clusters as detected peaks in all spectra and successively merges the closest clusters if all of the peaks of the new cluster belong to different spectra and

the maximal mass distance between two peaks of the new cluster is <0.2% of their mean. This tolerance corresponds to a measurement error of 0.1%.²²

Bioinformatics and Statistical Analysis

Unsupervised bidimensional cluster analysis of features showing wide variability was performed and displayed using the MeV package in the TM4 software suite.²⁰

Statistical differential analysis was performed for the signal intensities of the peaks detected. The SAM method was used to identify significant differentially expressed features while controlling for the false discovery rate.¹⁹

In high-throughput experiments, large number of features may display change with ordinary levels of significance (*i.e.*, $P < 0.05$) even when no biologic differences exist. One approach to surmount this problem in multiple comparisons is to identify the false discovery rate (q value). A valuable feature of SAM analysis is that it gives estimates of the false discovery rate, which is the proportion of features likely to have been identified by chance as being significant.

The protein ions were then analyzed using discriminant analysis (Systat 10.2; Richmond, CA) to identify combinations of proteins that best discriminate between disease states. A logistic regression model was also built using the same protein ions to calculate prediction scores for each sample, allowing us to construct a receiver operating characteristic curve based on these values.³¹

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the *Fondo de Investigaciones Sanitarias*, FIS 03/0557 and FIS 06/1222, and an Emili Letang Fellowship award (to L.F.Q.) from Hospital Clinic in Barcelona.

We thank Dr. Daniel Serón for providing urine samples (Hospital Bellvitge, Barcelona, Spain) and David Ovelheiro (LP CSIC/UAB) for informatics advice.

The LP CSIC/UAB is a member of ProteoRed, funded by Genoma Spain, and follows the quality criteria set up by ProteoRed standards.

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

1. US Renal Data System: US Renal Data System: Excerpts from the USRDS 2003 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States. *Am J Kidney Dis* 42: s1–s230, 2003
2. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK: Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 341: 1725–1730, 1999
3. Laupacis A, Keown P, Pus N, Krueger H, Ferguson B, Wong C, Muirhead N: A study of the quality of life and cost-utility of renal transplantation. *Kidney Int* 50: 235–242, 1996
4. Paul LC: Chronic allograft nephropathy: An update. *Kidney Int* 56: 783–793, 1999
5. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RDM, Jeremy R, Chapman JR: The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 349: 2326–2333, 2003
6. Ojo AO, Hanson JA, Wolfe RA, Leichtman AB, Agodoa LY, Port FK: Long-term survival in renal transplant recipients with graft function. *Kidney Int* 57: 307–313, 2000
7. Chapman JR. Longitudinal analysis of chronic allograft nephropathy: Clinicopathologic correlations. *Kidney Int Suppl* S108–S112, 2005
8. Kaplan B, Meier-Kriesche HU: Death after graft loss: An important late study endpoint in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2: 970–974, 2002
9. Knoll G, Muirhead N, Trpeski L, Zhu N, Badovinac K: Patient survival following renal transplant failure in Canada. *Am J Transplant* 5: 1719–1724, 2005
10. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Carvallo T: The Banff 97 working classification for renal allograft pathology. *Kidney Int* 55: 713–723, 1999
11. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, Campbell PM, Cascalho M, Collins AB, Demetris AJ, Drachenberg CB, Gibson IW, Grimm PC, Haas M, Lerut E, Liapis H, Mannon RB, Marcus PB, Mengel M, Mihatsch MJ, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Platt LJ, Randhawa P, Roberts I, Salinas-Madruga L, Salomon DR, Seron D, Sheaff M, Weening JJ: Banff '05 Meeting Report: Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 7: 518–526, 2007
12. Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* 63: 1193A–1203A, 1991
13. Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ, Massion PP, Larsen PH, White BC, Roberts JR, Edgerton M, Gonzalez A, Nadaf S, Moore JH, Caprioli RM, Carbone DP: Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet* 362: 433–439, 1991
14. Yanagisawa K, Tomida S, Shimada Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T: A 25-signal proteomic signature and outcome for patients with resected non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 99: 858–867, 2007
15. Schwartz SA, Weil RJ, Johnson MD, Toms SA, Caprioli RM: Protein profiling in brain tumors using mass spectrometry: Feasibility of a new technique for the analysis of protein expression. *Clin Cancer Res* 10: 981–987, 2004
16. Clarke W, Silverman BC, Zhang Z, Chan DW, Klein AS, Molmenti EP: Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis. *Ann Surg* 237: 660–664, 2003
17. Woroniecki RP, Orlova TN, Mendeleev N, Shatat IF, Hailpern SM, Kaskel FJ, Goligorsky MS, O'Riordan E: Urinary proteome of steroid-sensitive and steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Am J Nephrol* 26: 258–267, 2006
18. Schaub S, Rush D, Wilkins J, Gibson IW, Weiler T, Sangster K, Nicolle L, Karpinski M, Jeffery J, Nickerson P: Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 15: 219–227, 2004
19. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5116–5121, 2001
20. Saeed AI, Sharon V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J: TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34: 374–378, 2003
21. Zerefos P, Prados J, Kossida S, Kalousis A, Vlahou A: Sample preparation and bioinformatics in MALDI profiling of urinary proteins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 853: 20–30, 2007

22. Prados J, Kalousis A, Sanchez JC, Allard L, Carrette O, Hilario M: Mining mass spectra for diagnosis and biomarker discovery of cerebral accidents. *Proteomics* 4: 2320–2332, 2004
23. Serón D, Moreso F, Bover J, Condom E, Gil-Vernet S, Cañas C, Fulladosa X, Torras J, Carrera M, Grinyó JM, Alsina J: Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 51: 310–316, 1997
24. Yilmaz S, Tomlanovich S, Mathew T, Taskinen E, Paavonen T, Navarro M, Ramos E, Hooftman L, Hayry P: Protocol core needle biopsy and histologic chronic allograft damage index (CADI) as surrogate endpoint for long term graft survival in multicenter studies. *J Am Soc Nephrol* 14: 773–779, 2003
25. Nankivell BJ, Fenton-Lee CA, Kuypers DRJ, Cheung E, Allen RD, O'Connell PJ, Chapman JR: Effect of histological damage on long-term kidney transplant outcome. *Transplantation* 71: 515–523, 2001
26. Cosio FG, Grande JP, Wadei H, Larson T, Griffin M, Stegall M: Predicting subsequent decline in kidney allograft function from early surveillance biopsies. *Am J Transplant* 5: 2464–2472, 2005
27. Haas M, Montgomery RA, Segev DL, Rahman MH, Racusen LC, Bagnasco SM, Simpkins CE, Warren DS, Lepley D, Zachary AA, Kraus ES: Subclinical acute antibody-mediated rejection in positive crossmatch renal allografts. *Am J Transplant* 6: 1–10, 2006
28. Serón D, Moreso F: Protocol biopsies in renal transplantation: Prognostic value of structural monitoring *Kidney Int* 72: 690–697, 2007
29. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, Cecka MJ, Cosyns J-P, Demetris AJ, Fishbein MC, Fogo A, Furness P, Gibson IW, Glotz D, Hayry P, Hunsickern L, Kashgarian M, Kerman R, Magil AJ, Montgomery R, Morozumi K, Nickleit V, Randhawa P, Regele H, Seron D, Seshan S, Sund S, Trpkov K: Antibody-mediated rejection criteria—An addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 3: 708–714, 2003
30. Vongwiwatana A, Gourishankar S, Campbell PM, Solez K, Halloran PF: Peritubular capillary changes and C4d deposits are associated with transplant glomerulopathy but not IgA nephropathy. *Am J Transplant* 4: 124–129, 2004
31. Zweig MH, Campbell G: Receiver-operating characteristic (ROC) plots: A fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 39: 561–577, 1993 [erratum appears in *Clin Chem* 39: 1589, 1993]

Supplemental information for this article is available online at <http://www.jasn.org/>.

See related editorial, "Proteomic Portrayal of Transplant Pathologies," on pages 236–238.

Segundo Trabajo

Application of label-free quantitative peptidomics for the identification of urinary biomarkers of kidney chronic allograft dysfunction. Mol Cell Proteomics. 2009 Apr 7. [Epub ahead of print]

Application of Label-free Quantitative Peptidomics for the Identification of Urinary Biomarkers of Kidney Chronic Allograft Dysfunction*[§]

Luis F. Quintana^{‡§¶}, Josep M. Campistol^{‡§}, Maria P. Alcolea^{||},
Elisenda Bañon-Maneus[§], Amanda Solé-González[§], and Pedro R. Cutillas^{||**}

AQ: A The advent of quantitative proteomics opens new opportunities in biomedical and clinical research. Although quantitative proteomics methods based on stable isotope labeling are in general preferred for biomolecular research, biomarker discovery is a case example of a biomedical problem that may be better addressed by using label-free MS techniques. As a proof of concept of this paradigm, we report the use of label-free quantitative LC-MS to profile the urinary peptidome of kidney chronic allograft dysfunction (CAD). The aim was to identify predictive biomarkers that could be used to personalize immunosuppressive therapies for kidney transplant patients. We detected (by LC-M/MS) and quantified (by LC-MS) 6000 polypeptide ions in undigested urine specimens across 39 CAD patients and 32 control individuals. Although unsupervised hierarchical clustering differentiated between the groups when including all the identified peptides, specific peptides derived from uromodulin and kininogen were found to be significantly more abundant in control than in CAD patients and correctly identified the two groups. These peptides are therefore potential biomarkers that might be used for the diagnosis of CAD. In addition, ions at m/z 645.59 and m/z 642.61 were able to differentiate between patients with different forms of CAD with specificities and sensitivities of 90% in a training set and, significantly, of ~70% in an independent validation set of samples. Interestingly low expression of uromodulin at m/z 638.03 coupled with high expression of m/z 642.61 diagnosed CAD in virtually all cases. Multiple reaction monitoring experiments further validated the results, illustrating the power of our label-free quantitative LC-MS approach for obtaining quantitative profiles of urinary polypeptides in a rapid, comprehensive, and precise

AQ: B

AQ: C

AQ: D

fashion and for biomarker discovery. *Molecular & Cellular Proteomics* 8:xxx-xxx, 2009.

A major goal of clinical proteomics is to identify biomarkers that can aid in the diagnosis and prognosis of different conditions. In their ideal form, these biomarkers will not only assist the clinician in the diagnosis of a disease, but they will also give directions as to which therapy may be more appropriate for each patient, thus contributing to the development of personalized medicine. In this regard, urine represents an ideal, but yet largely unexplored, source of biomarkers because of the presence of large numbers of small peptides in this biological fluid and because it can be obtained non-invasively.

However, although proteomics techniques are instrumental for increasing our understanding of molecular cell biology (1) the impact of proteomics in clinical practice has not yet reached initial expectations perhaps because of technological limitations (2, 3). Using hyphenated methods such as novel LC-MS techniques for quantitative proteomics (4, 5) may prove advantageous for the identification and validation of biomarkers (3, 6). This is because LC-MS allows the detection of proteomes with greater depth, dynamic range, and enhanced accuracy of quantization than when using one-dimensional profiling techniques that record all ions in a single mass spectrum, such as MALDI-TOF MS or SELDI-TOF MS (7). On-line LC-ESI-MS is quantitative in nature because the initial LC separation step contributes to reducing the amount of analytes that are simultaneously ionized, thus reducing the possibility of ion suppression, and because ion formation by electrospray ionization is proportional to analyte concentration (8, 9). Initial reports that used LC-MS for the analysis of the urinary proteome provided proof of principle of the use of this technique for the analysis of urinary polypeptides (10–12), and recently, using new generation LC-MS/MS instrumentation, more than 1500 proteins have been detected in urine (13). Nevertheless despite these advances in our understanding of the *qualitative* composition of the urinary proteome, precise and comprehensive *quantification* of urinary polypeptides to discover potential biomarkers remains a challenge.

From the [‡]Servicio de Nefrología y Trasplante renal and [§]Laboratorio Experimental de Nefrología y Trasplante renal (LENIT), Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universidad de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain and ^{||}Analytical Signalling Group, Centre for Cell Signalling, Institute of Cancer, Barts and the London and Queen Mary Medical School, Queen Mary University of London, London EC1M 6BQ, United Kingdom

Received, February 4, 2009, and in revised form, March 24, 2009

Published, MCP Papers in Press, April 7, 2009, DOI 10.1074/mcp.M900059-MCP200

Peptidomics in Kidney Transplantation

The ideal, and more widely used, strategies to derive quantitative information from LC-MS experiments are based on differential stable isotope labeling of proteins or peptides, which are then mixed and quantified relative to each other in single multidimensional LC-LC-MS experiments (14). This technique, however, is not ideal for biomarker discovery because of problems associated with protein derivatization in a clinical setting, because of its limited throughput, and because, although not impossible, isotope labeling techniques make it difficult to compare a large number of specimens; at present labeling reagents can be used for simultaneous comparison of up to eight protein samples (15).

Novel analytical strategies for quantitative proteomics that do not require isotope labeling have been reported (4, 5, 16). These techniques can quantify polypeptides with precisions and accuracies comparable to those based on isotope labeling (17). In addition, such label-free quantitative LC-MS approaches can compare an unlimited number of samples, and it is therefore ideal for biomarker discovery as experimental designs normally involve comparing a large number of specimens to statistically validate the results. Thus, label-free quantitative LC-MS would clearly assist in analyzing the full potential of urine clinical samples as a source of disease biomarkers. The aim of the study presented herein was to prove this concept taking chronic allograft dysfunction (CAD)¹ as a paradigm.

During the last years, the incidence and prevalence of end stage renal disease has increased worldwide (18). Successful renal transplantation improves the patients' quality of life and increases survival as compared with long term dialysis treatment (19). However, despite these improvements, a substantial portion of grafts develop progressive dysfunction and fail within a decade even with the use of appropriate doses of immunosuppressive drugs to prevent acute rejection (20). CAD is responsible for more than 50% of graft losses and remains a central clinical challenge. Although patients can return to dialysis after transplant failure, loss of a functioning graft is associated with a 3-fold increase in the risk of death, a substantial decrease in quality of life for those who survive, and a 4-fold increase in healthcare costs (21).

CAD is mediated by a combination of immune, ischemic, and inflammatory stimuli, and multiple pathways and mediators lead to cumulative structural damage to all compartments of the transplanted kidney. Sclerosing changes associated with tubulointerstitial injury are mediated by the processes of active fibrogenesis, resulting in epithelial loss and the pheno-

type of tubular atrophy and chronic interstitial fibrosis (22). Available diagnostic methods include clinical presentation, biochemical parameters, and biopsies. Currently the only non-invasive biomarker of CAD is serum creatinine and glomerular filtration rate (GFR), but neither is particularly sensitive or specific and may not reflect early alterations (20, 22). At present, biopsy allograft is regarded as the gold standard for the diagnosis of CAD allowing its early detection; however, this is a costly procedure that is associated with clinical complications (23).

Clinicians are hence faced with a dilemma. On the one hand, protocol biopsies may detect rejection at an earlier subclinical stage and allow prompt initiation of treatment, which may translate into improved long term graft survival (24). On the other hand, this also implies that patients with preserved graft function, *i.e.* without CAD, undergo this invasive procedure unnecessarily. Therefore, identification of non-invasive biomarkers for the early diagnosis of CAD would be invaluable for alleviating the major health and economic burden that this condition causes to western countries (25).

The aim of the present study was to evaluate whether the urinary peptidome, as analyzed by a novel analytical strategy based on label-free quantification of urinary polypeptides by LC-MS, would differentiate between patients with CAD, those showing stable renal transplant (SRT), and a group of living donors. To our knowledge, this represents the first study reporting urine polypeptide signatures and individual biomarkers that group patients according to their underlying renal phenotype and hence represent potential candidates for non-invasive diagnosis of CAD.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Study Cohorts

Seventy-one individuals were included in the present study: an initial training experiment analyzed 18 patients with clinical and histopathological characterization of CAD and 14 controls. CAD patients were recipients of a renal graft that received immunosuppressive treatment with levels in the therapeutic range of a calcineurin inhibitor, mycophenolate mofetil, and prednisone. These patients fell into two groups: 1) eight patients (five men and three women) with interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA) and no evidence of any specific etiology (*IF/TA group*) and 2) 10 patients (seven men and three women) with chronic active antibody-mediated rejection (CAAR) defined by morphological features including transplant glomerulopathy (TG), IF/TA with or without peritubular capillary loss, fibrous intimal thickening in arteries without duplication of the internal elastica, diffuse C4d deposition in peritubular capillaries, and the presence of donor-specific antibody (*CAAR group*). There were no significant differences between the IF/TA and CAAR groups with respect to age, gender, diabetes duration, arterial blood pressure, body mass index, and GFR.

The controls fell into two groups: 1) *stable renal transplant recipients*: five (three men and two women) live donor recipients of a first renal graft who were at the end of the 1st month after surgery with normal transplant biopsy and followed immunosuppressive treatment with a calcineurin inhibitor, mycophenolate mofetil, and prednisone; and 2) *healthy controls*: nine volunteers (six men and three women) with normal blood pressure (systolic blood pressure <130 mm Hg

¹ The abbreviations used are: CAD, chronic allograft dysfunction; CAAR, chronic active antibody-mediated rejection; GFR, glomerular filtration rate; IF/TA, interstitial fibrosis and tubular atrophy; MRM, multiple reaction monitoring; RAS, renin-angiotensin system; SRT, stable renal transplant; TG, transplant glomerulopathy; XIC, extracted ion chromatogram; PESCAL, Peak Statistic Calculator; NCBI, National Center for Biotechnology Information; CV, coefficient of variation; S/N, signal to noise ratio; u, mass unit.

Fn1

AQ: DD

and diastolic blood pressure <80 mm Hg) and no history of diabetes mellitus, ischemic heart disease, stroke, or peripheral vascular disease). Base-line clinical parameters are shown in Table I, training set. Nephroangiosclerosis was the cause of kidney failure in 60% of transplant patients, 20% had IgA nephropathy, and 20% had no evidence of any specific etiology. There were no significant differences among the etiology of renal disease between transplants patients with CAD and stable renal function.

A second validation set of samples included a population of 21 CAD patients (10 IF/TA and 11 CAAR) unrelated to the training set of samples and 18 controls (nine SRT and nine unaffected individuals). Criteria for diagnosis were as in the training set, and base-line clinical parameters are shown in Table I, validation set. These studies were approved by the institutional review board at the Hospital Clinic in Barcelona, and both patients and controls gave informed consent for the collection and analysis of their urine.

Histopathology

Transplant biopsies consisted of two cores obtained with 18-gauge needles using ultrasound guidance because of clinical indication. Paraffin sections were prepared and stained with hematoxylin-eosin, trichrome, periodic acid-Schiff, and periodic acid-Schiff-methenamine silver. The biopsies were analyzed and were scored according to the Banff classification by a pathologist who was blinded to the results of molecular studies (26). TG was diagnosed by light microscopy based on double contours of glomerular basement membranes (27) and was supported by immunofluorescence studies, which showed mesangial IgM and/or C3 or negative immunofluorescence findings. Peritubular capillaritis in TG biopsies was graded according to the quantitative criteria of the last Banff update (26). The sections from the frozen biopsies were incubated with the murine monoclonal anti-human C4d 100 IL (Quidel Corp., San Diego, CA) and stained with fluorescent antiserum (CyTM2-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA).

Sample Preparation and Purification for MS Analysis

Fifty milliliters of early morning urine were collected immediately prior to renal biopsy. Protease inhibitor mixture (Complete Mini, Roche Applied Science) was added, and specimens were rapidly frozen in dry ice and stored at -80°C until analyzed. Urine samples were concentrated, and polypeptides were separated from inorganic salts by solid phase extraction using a reversed phase hydrophilic-lipophile balance (HLB) Oasis 94226 (Waters, Milford, MA) as the stationary phase essentially as described previously (11) with minor modifications. Briefly cartridges were conditioned with 10 ml of 100% ACN and equilibrated with 10 ml of 0.1% TFA, 5% ACN. After loading 1 ml of sample (acidified to 0.1% TFA at pH 3 and a final concentration of 5% ACN by adding 10 μl of 10% TFA and 50 μl of ACN), the cartridge bed was washed with 10 ml of 0.1% TFA, 5% ACN, and peptides were subsequently eluted with 2 ml of 0.1% TFA, 60% ACN. Separation from organic salts was by strong cation exchange using magnetic beads (Dynabeads, Invitrogen) as follows. Beads were conditioned with 1 M NaCl, 50 mM ammonium bicarbonate, pH 8.8 and equilibrated with loading solution (0.1% TFA, 20% ACN). After application of the sample from the reversed phase step, bound peptides were washed three times with loading solution. Elution was with 500 mM ammonium acetate in 20% ACN. Eluted peptides were dried in a SpeedVac and stored at -80°C .

Mass Spectrometry

Dry peptides were dissolved in 10 μl of 0.1% TFA, 2% ACN, and 10% of this solution was analyzed in an LC-MS/MS system that

consisted of a nanoflow ultrahigh pressure liquid chromatograph (Acquity, Waters/Micromass) connected on line with a Q-TOF Premier mass spectrometer (Waters/Micromass) equipped with a nano-ESI ion source. Separations were performed in a bridged ethyl hybrid (BEH) 100- μm \times 100-mm column (Waters/Micromass) at a 400 nl/min flow rate with an operating back pressure of about 3000 p.s.i. Gradient runs were from 2% B to 30% B in 30 min followed by a 5-min wash at 80% B and a 7-min equilibration step at 2% B. Solvent A was 0.1% formic acid in LC-MS grade water (Optigrade, LGC), and solvent B was 0.1% formic acid in LC-MS grade ACN (Optigrade, LGC). For LC-MS/MS experiments, survey MS scans of 500 ms were followed by three MS/MS scans (500 ms each), which were triggered in data-dependent mode when multiply charged ions in the MS survey scans were above 15 counts/s. Peptide quantification was performed by LC-MS analysis, acquiring 1-s survey scans. No MS/MS functions were included in the quantification protocol, but otherwise the settings were the same as for the LC-MS/MS experiments.

Data Analysis

Quantification—Lists of ions selected for MS/MS were fed into PESCAL, a program written in-house for the automation of label-free LC-MS data analysis (4). PESCAL uses the m/z and retention time of the ions detected to construct extracted ion chromatograms (XICs) across the LC-MS runs of individual urine samples. Windows for XIC construction were 25 ppm and 2 min for m/z and retention time, respectively. The intensity values (peak areas and heights) of these XICs were parsed into Excel files for normalization, statistical manipulation, and analysis. Peak intensity values were normalized to the mean intensity of all peaks within a sample and then to the mean of the individual peptide ions across the samples. These values were further normalized to creatinine content in the respective urine sample.

Statistical Analyses—For unsupervised clustering analysis, normalized ion intensity values were log-converted and fed into Cluster Eisein software (28) for clustering and TreeView Eisein software for visualization of the clustering results.

The non-parametric Kuskal-Wallis test was used to infer the statistical significance of LC-MS results when more than two sample groups were compared, whereas Mann-Whitney U test was for two-group comparisons. These analyses were performed using a commercial statistical software package (GraphPad Prism 4.03).

Statistical significance of clinical chemistry tests was inferred by the Student's t test. Relative levels of polypeptide ions were also analyzed using discriminant analysis (Systat, version 10.2, Systat Software Inc., Richmond, CA) to identify combinations of these polypeptides that best discriminate between disease states. A logistic regression model was also built using the same polypeptide ions to calculate prediction scores for each sample, allowing us to construct a receiver operating characteristic curve based on these values (29).

MS/MS Data Analysis—The identity of a subset of peptides detected was determined by searching MS/MS spectra against the Swiss-Prot database version 5.1.6 restricted to human entries (15,720 sequences) using the Mascot search engine. Searches were restricted to 50 and 100 ppm for parent and fragment ions, respectively. No enzyme restriction was selected. Hits were considered significant when they were above the statistical significant threshold (as returned by Mascot) and at least two peptides matched a protein entry. Selected MS/MS spectra were also searched by MS-Tag and MS-Homology (Protein Prospector v5.1.8 Basic) against NCBI (November 25, 2008) and Swiss-Prot (June 10, 2008) databases.

LC-Multiple Reaction Monitoring (MRM)-MS/MS

"pseudoMRM" was performed in the Q-TOF Premier/nano-ultra-performance LC system described above using a 10-min gradient

Peptidomics in Kidney Transplantation

TABLE I

Clinical characteristic of training set and validation set cohorts and controls groups

IF/TA, IF/TA with no other etiology; GFR, GFR from serum creatinine estimate by Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study (49) equation ($eGFR = 186 \times (SCR)^{-1.154} \times (age)^{-0.203} \times (0.742 \text{ if female}) \times (1.21 \text{ if African American})$).

	CAD (mean \pm S.D.)		Control (mean \pm S.D.)	
	IF/TA group	CAAR group	Stable renal transplant recipients	Healthy controls
Training set				
Sample number (n)	8	10	5	9
Age (yr)	51 \pm 10.69	47.22 \pm 17.07 ^a	36.2 \pm 8	43 \pm 10
Creatinine (mg/dl)	3.2 \pm 1.68	2.98 \pm 1.64 ^a	1.08 \pm 0.3	0.91 \pm 0.3
GFR (ml/min/1.73 m ²)	28.88 \pm 17.65	33.44 \pm 12.05 ^a	82.22 \pm 4	110 \pm 10
Proteinuria (g/24 h)	2.67 \pm 2.90	3.11 \pm 3.33 ^a	0.20 \pm 0.05	0.11 \pm 0.02
Validation set				
Sample number (n)	10	11	9	9
Age (yr)	53.7 \pm 17.8	54.09 \pm 12.08 ^a	50.1 \pm 13	41 \pm 9.5
Creatinine (mg/dl)	2.49 \pm 0.74	2.05 \pm 0.37 ^a	0.96 \pm 0.1	0.78 \pm 0.11
GFR (ml/min/1.73 m ²)	28.34 \pm 8.76	31.6 \pm 9.5 ^a	83.9 \pm 14.5	103 \pm 12
Proteinuria (g/24 h)	1.37 \pm 1.44	1.84 \pm 2.47 ^a	0.17 \pm 0.10	0.11 \pm 0.51

^a *t* test not significant between IF/TA versus CAAR groups.

(2–35% B in 10 min). Five ions were monitored simultaneously (at *m/z* 610.7, 638.0, 642.6, 645.6, and 1096.8) in alternative scans at a rate of 150 ms/scan. Typical chromatographic peak widths were 20–40 s at the base, which ensured collection of >10 points per chromatographic peak. The transitions monitored are shown in Fig. 8, and this was done by calculating peak areas of XICs of added ion intensities of the most intense fragment ions. CID was performed with a ramp collision energy of 22–30 eV in the 150-ms scan. The Quantitate function in MassLynx was used to automate these analyses. The integration of each chromatographic peak was corrected manually to ensure accurate quantification. Values were normalized to creatinine content.

RESULTS

Patients—We aimed to identify urinary peptides that could serve as biomarkers of CAD. For this purpose, 14 controls and 18 specimens with well defined clinical features were included in an initial training set; the results were then validated in a second set of samples using an unrelated patient population consisting of 21 CAD and 18 control individuals.

The control groups showed normal blood pressure (systolic blood pressure <130 mm Hg and diastolic blood pressure <80 mm Hg) and no history of diabetes mellitus, ischemic heart disease, stroke, or peripheral vascular disease. Table I shows the base line of the control clinical parameters in training and validation set experiments.

The IF/TA and CAAR groups did not present significant differences with respect to age, gender, diabetes duration, arterial blood pressure, body mass index, and GFR. However, they both were classified into IF/TA and CAAR (CAD subgroups) according to histopathological criteria. Table II (left) summarizes Banff scores in the IF/TA and CAAR groups of the training set. IF/TA patient histopathology showed evidence of neither CAAR nor TG, and C4d was negative. Mean glomerular double contour score was 1.89, and C4d was positive in all patients in the CAAR group. Evidence of chronic active T cell-mediated rejection was excluded in all samples. Criteria for diagnosis of the second validation subset of patients were

as in the training set of samples, and Table II (right) shows the Banff scores in the IF/TA and CAAR groups of this validation study.

Analytical Strategy—To increase the probabilities of identifying useful biomarkers of CAD, we aimed at quantifying urinary peptides across samples as comprehensively and accurately as possible. For this, we used an analytical strategy that consists of using the LC-MS elution profiles of individual peptide ions that had been detected previously in LC-MS/MS experiments. PESCAL software was used for the automation of this analysis. This is therefore a targeted quantification strategy because we only quantified (by LC-MS) those ions that had been detected previously (although not necessary identified) in urine by data-dependent LC-MS/MS. To generate a list of quantifiable urinary peptides, we pooled undigested urinary peptides from the same patient group and analyzed them by LC-MS/MS. These analyses were performed in triplicate (three times per sample group), generating in each replicate LC-MS/MS experiment a list of identified peptides that we then used as an exclusion list in the following LC-MS/MS run as reported before (11). Approximately the same numbers of MS/MS spectra were obtained per sample group. These experiments resulted in the selection of 6250 multiply charged ions for MS/MS. It should be noted that this was an unfiltered list, and many of these ions were detected in more than one sample pool. Targeted quantification of the 6250 ions that had been identified by data-dependent MS/MS acquisition was then performed by integration of the extracted ion chromatogram peak areas from LC-MS data of individual samples (without pooling); this was achieved by using PESCAL software.

To exemplify how this analytical strategy works, Fig. 1A shows representative LC-MS ion chromatograms from urine peptide mixtures of IF/TA, CAAR, SRT, and control donors. Each of the peaks in these chromatograms was formed by the

TABLE II

Histopathology of allograft biopsies of the training set and validation set

IF/TA, IF/TA with no other etiology. Transplant biopsies were normal in stable renal recipients.

	Training set (mean \pm S.D.)		Validation set (mean \pm S.D.)	
	IF/TA group (n = 8)	CAAR group (n = 10)	IF/TA group (n = 10)	CAAR group (n = 11)
Glomerular double contours (cg)	0	1.89 \pm 0.7 ^a	0	1.82 \pm 0.75 ^a
Interstitial fibrosis (ci)	1.88 \pm 0.9	2.11 \pm 0.7 ^b	1.9 \pm 0.56	2.18 \pm 0.6 ^b
Tubular atrophy (ct)	1.88 \pm 0.9	2.11 \pm 0.7 ^b	1.9 \pm 0.56	2.18 \pm 0.6 ^b
Arterial fibrous intimal thickening (cv)	0.88 \pm 0.6	1.56 \pm 1.0 ^a	1.6 \pm 0.69	1.36 \pm 0.67 ^a
Hyaline arteriolar thickening (ah)	0.75 \pm 1.1	1.56 \pm 1.1 ^b	1.5 \pm 0.7	1.73 \pm 0.46 ^b
Peritubular capillaritis (ptc)	0.75 \pm 0.4	1.33 \pm 0.7 ^b	0.4 \pm 0.69	1.64 \pm 0.5 ^a

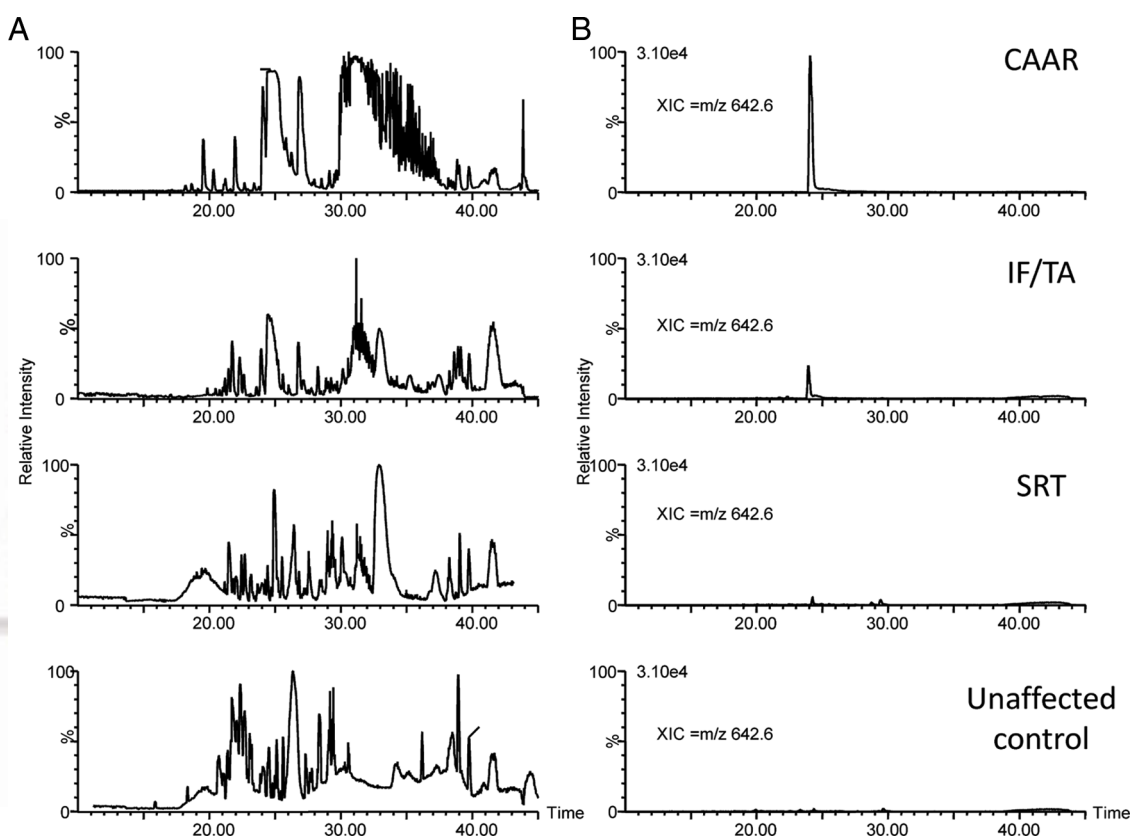
^a Significant Mann-Whitney test ($p < 0.05$).^b Non-significant Mann-Whitney test.

FIG. 1. Label-free quantitative strategy for the identification of urinary biomarkers of CAD. Representative base peak ion chromatograms (A) and representative XIC of an ion at m/z 642.6 across the indicated sample group (B) are shown.

AQ: KK

elution of several polypeptides, and therefore, by themselves, they cannot be used to quantify individual peptides. For quantification, we calculated the area under the curve of a chromatogram obtained from the elution profile of each individual peptide, *i.e.* an XIC, an example of which is shown in Fig. 1B. To make this approach practical, we used PESCAL, an in-house computer program to automate the creation of these XICs and calculate their intensities; PESCAL also allows matching the XICs with those from the peptides identified previously by LC-MS/MS (4). In the illustrative example shown in Fig. 1B, a molecular ion at m/z 642.6 was present with about 5-fold enrichment in CAAR urine compared with IF/TA

and at least 15-fold enhancement when compared with SRT and control samples. AQ: O

To investigate the linearity of the technique and the potential of matrix effects contributing to variability, we spiked control urine with standard peptides, which were then analyzed by our LC-MS methods. As Fig. 2A shows the signals of the standard peptide angiotensin II were not affected by increasing amounts of matrix in the sample, arguing against the occurrence of ion suppression with these settings. Similarly these signals were linear over at least a 40-fold range (Fig. 2B). We also analyzed endogenous urinary peptides at different urine volumes and found that the signals of these

F2

Peptidomics in Kidney Transplantation

A Estimation of precision and matrix effects. 1 nM of standard peptide spiked in increasing volumes of urine

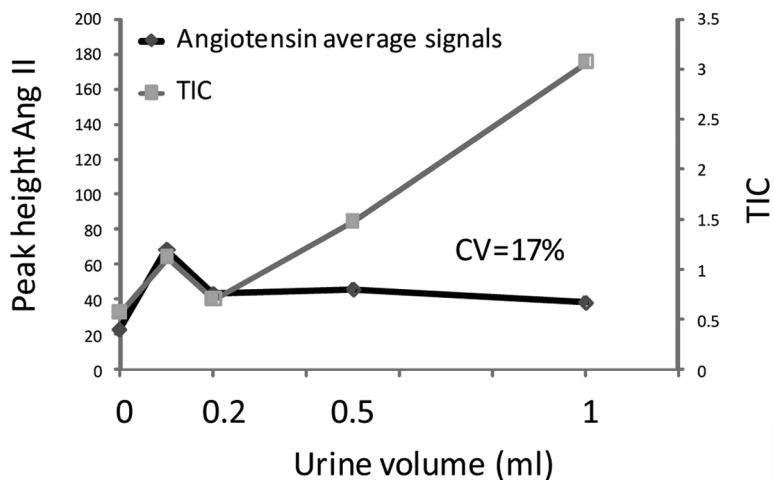
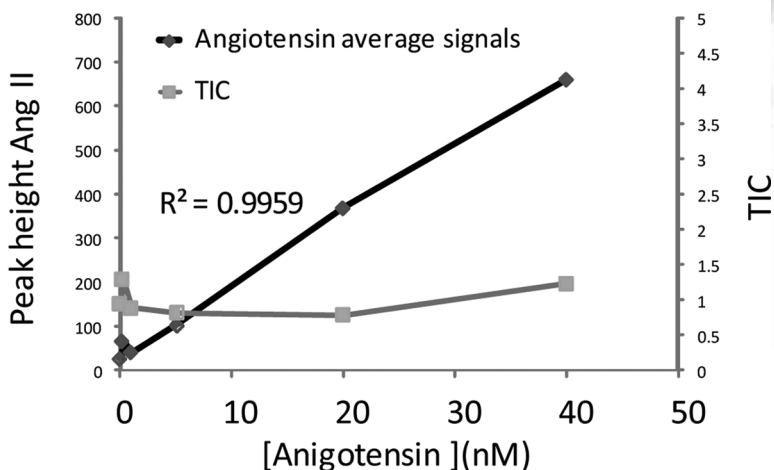


FIG. 2. Linearity of label-free LC-MS of a peptide spiked in urine. A, the signal of angiotensin II (*Ang II*), a standard peptide spiked in increasing volumes of urine, was not affected by increasing concentrations of matrix ions. B, the signal of increasing amounts of the same peptide as in A was linear in a constant background of matrix ions. TIC, total ion chromatogram.

AQ: LL

AQ: MM

B Estimation of accuracy. Increasing concentrations of a standard peptide spiked in 1 ml of urine



F3

were linear over a 10-fold volume range (Fig. 3A). Replicate experiments demonstrated good reproducibility (coefficients of variation (CVs) between 9 and 13%; Fig. 3B). Thus, the data in Figs. 2 and 3 indicate that signals obtained with our LC-MS technique are linear over a useful working range and that matrix effects are not significant probably because of the extensive extraction and separation used (reversed phase and strong cation exchange extraction followed by a 30-min gradient in an ultrahigh pressure LC instrument) and the low probability of ion suppression to occur when using nanoelectrospray as the ionization source (30, 31). This is in

AQ: P

line with previous reports demonstrating accurate quantification of polypeptides by label-free LC-MS (4, 5).

Hierarchical Clustering of Label-free Quantitative LC-MS Data Classifies Urinary Peptidomes According to Their Underlying Pathological Phenotype—As mentioned above, using this strategy we detected ~6250 ions in our analyses before filtering and about 2300 after deleting duplicates; and for all of them we obtained XICs and calculated their intensities. Initial experiments demonstrated that it was possible to differentiate control and CAAR patients based on unsupervised hierarchical clustering using the intensities of all the identified peptides

Peptidomics in Kidney Transplantation

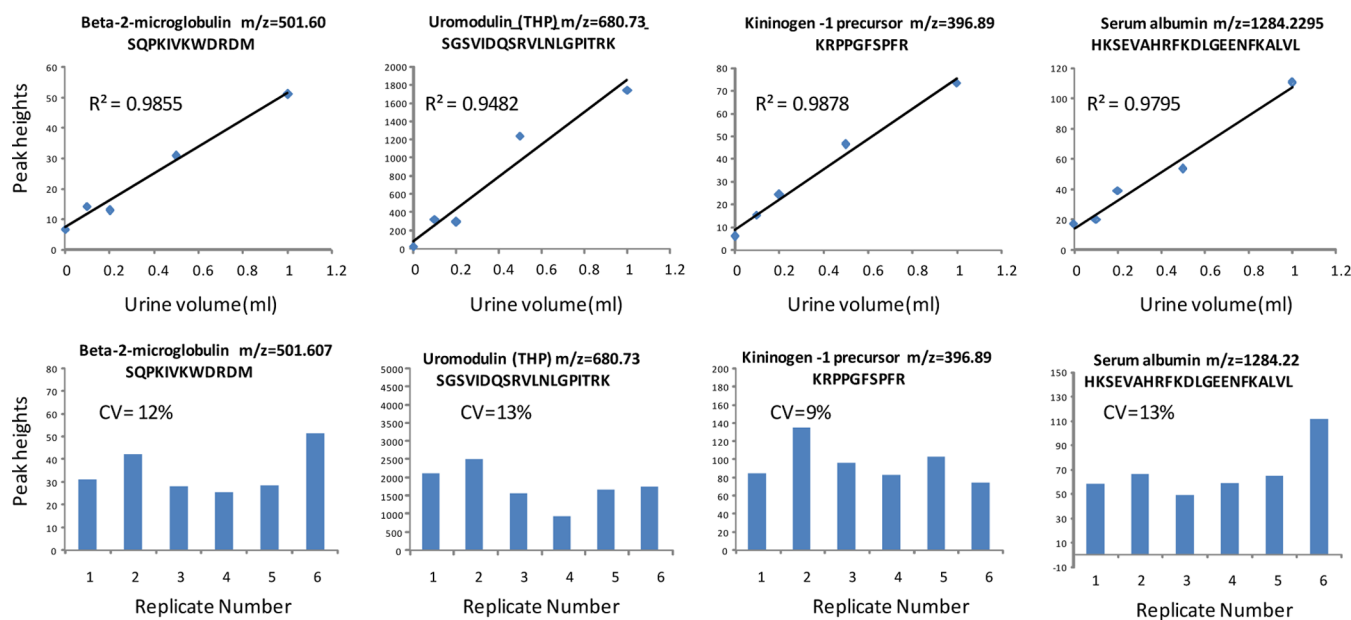


FIG. 3. Precision and accuracy of signals of endogenous urinary peptides as determined by label-free LC-MS. The top panel graphs show that the intensities of representative urinary peptides were linear relative to the amount of sample analyzed by LC-MS. The bottom graphs show the reproducibilities of signal intensities generated in replicate LC-MS runs. CVs were defined as mean/S.D. \times 100. THP, Tamm-Horsfall glycoprotein.

AQ: NN

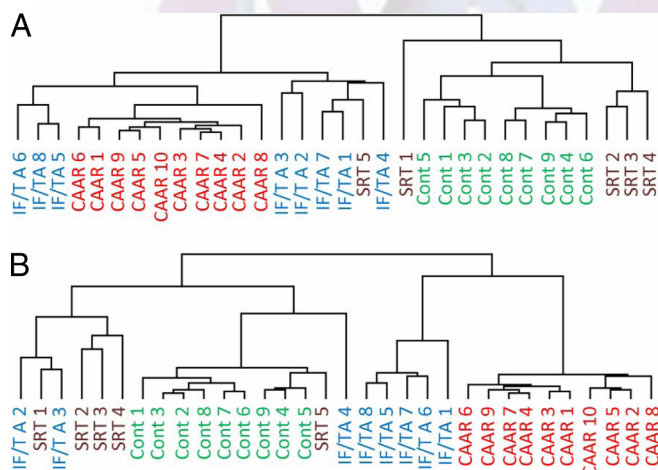


FIG. 4. Unsupervised hierarchical clustering analysis classifies individual patients according to their underlying pathological phenotype. The figure shows hierarchical clustering trees based on quantitative urinary polypeptide data from CAD subtypes (CAAR and IF/TA) and control specimens (SRT and control (Cont)) considering the whole data set (A) and the least variable 500 molecular ions (B).

AQ: OO

F4

with SRT and IF/TA showing some overlap (Fig. 4A). Filtering of the data to include only the 500 peptide ions showing the least statistical variability in their peak intensities resulted in a similar clustering pattern (Fig. 4B). Unlike Fig. 4A where one SRT patient was placed in the CAAR/IF/TA cluster, when considering only 500 peptides the SRT and control were completely separated from CAAR. Further filtering to include lower numbers of peptides for hierarchical clustering gave results similar to those in Fig. 4B (data not shown). These results

indicate that the polypeptide composition in the urine of CAD patients is significantly different from that of SRT and control subjects and that our label-free quantitative LC-MS strategy can detect these differences.

Identification of Peptides Derived as Specific Biomarkers for the Diagnosis of CAD

To characterize in more detail the molecular differences between these specimens, we compared the intensities of the subset of peptides that produced statistically significant differences. Peptides at m/z 638.03, m/z 956.56, and 1003.62 were significantly more abundant in control patients than in the other groups (Fig. 5A). Importantly these peptides showed greater intensities in SRT than in CAAR samples with a significant -fold change from 4.0 to 8.9, a fact of great clinical relevance because these data indicate that these biomarkers may allow monitoring the evolution of the transplanted kidney. MS/MS data demonstrated that these peptides are derived from uromodulin and kininogen (supplemental data). Their expression in individual patients revealed that, although the differences were more apparent in the kinins, uromodulin peptides were consistently more abundant in control and SRT than in CAD groups, showing a lower variability (Fig. 5, A and C). The individual peptide ions that best discriminated between controls and CAD groups were those derived from uromodulin at m/z 638 (SGSVIDQSRVNLNLPITR) and kininogen at m/z 1003 (DLIATMMPPISPAPIQSDDDWIPDIQI), resulting in correct discrimination between control and CAD patients of 84% (14 of 18). These results were corroborated by a logistic regression analysis, which resulted in selection of the same ions. A receiver operating

F5

ZSI

AQ: Q

Peptidomics in Kidney Transplantation

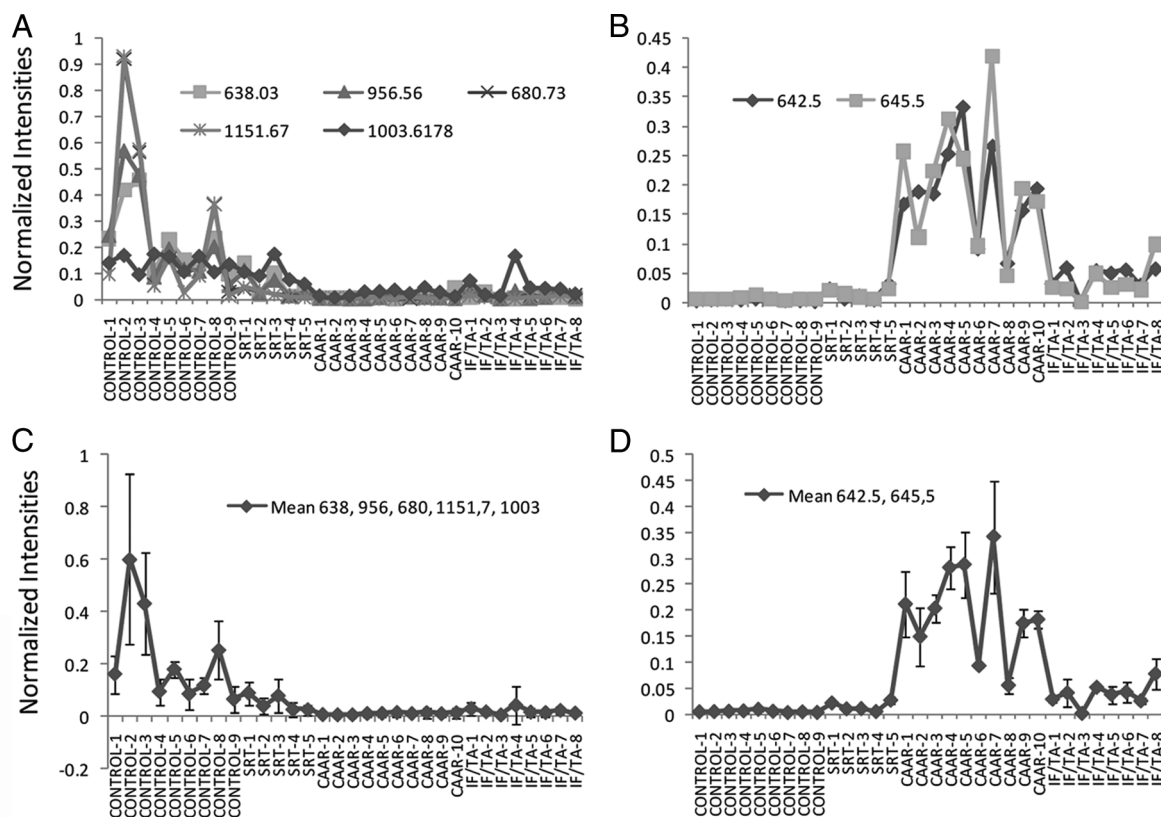


FIG. 5. Specific peptides are potential biomarkers for the diagnosis of chronic allograft dysfunction. *A*, normalized ionic intensities of individual peptides derived from uromodulin and kinin present higher levels in control than in CAD urines. *B*, normalized intensities of individual unknown ions show higher levels in control than in CAD urines. *C*, mean \pm S.D. expression of peptides shown in *A*. Kruskal-Wallis test was significant at $p < 0.0001$. The difference between control subtypes *versus* CAD subtypes was significant at $p < 0.0001$. The means within control and CAD subgroups were not significant ($p > 0.05$). *D*, means of ions shown in *B*. The data were significantly different ($p < 0.0001$, Kruskal-Wallis test). The differences between CAD and control means were significant at $p < 0.0001$. The means of CAAR *versus* IF/TA were also significantly different ($p < 0.0001$).

AQ: PP

characteristic curve constructed from the logistic regression scores gave an area under the curve value of 0.82.

AQ: R

A greater sensitivity was achieved by considering the mean intensity of all the peptides derived from uromodulin. Indeed this value could correctly identify 94% (17 of 18) of all CAD patients with 100% specificity (none of the control group had low levels of uromodulin peptides; Fig. 5C). In addition, the statistical analysis performed using all the uromodulin peptides reached significant differences not only between SRT and CAAR (6.3 ± 1.9 -fold change) but also between SRT and IF/TA (3.8 ± 1.3 -fold change). Therefore, a combination of biomarkers had more discriminatory power than any of the single biomarkers we identified and clearly showed a potential to follow the progression stage of renal transplant. This fact argues that using the mixture of peptide biomarkers identified herein would increase the specificity and sensitivity of CAD diagnosis.

Other peptides could be identified in these specimens, but they did not provide discriminatory information. As an example, peptides derived from β_2 -microglobulin did not show significant differences between the studied groups in most

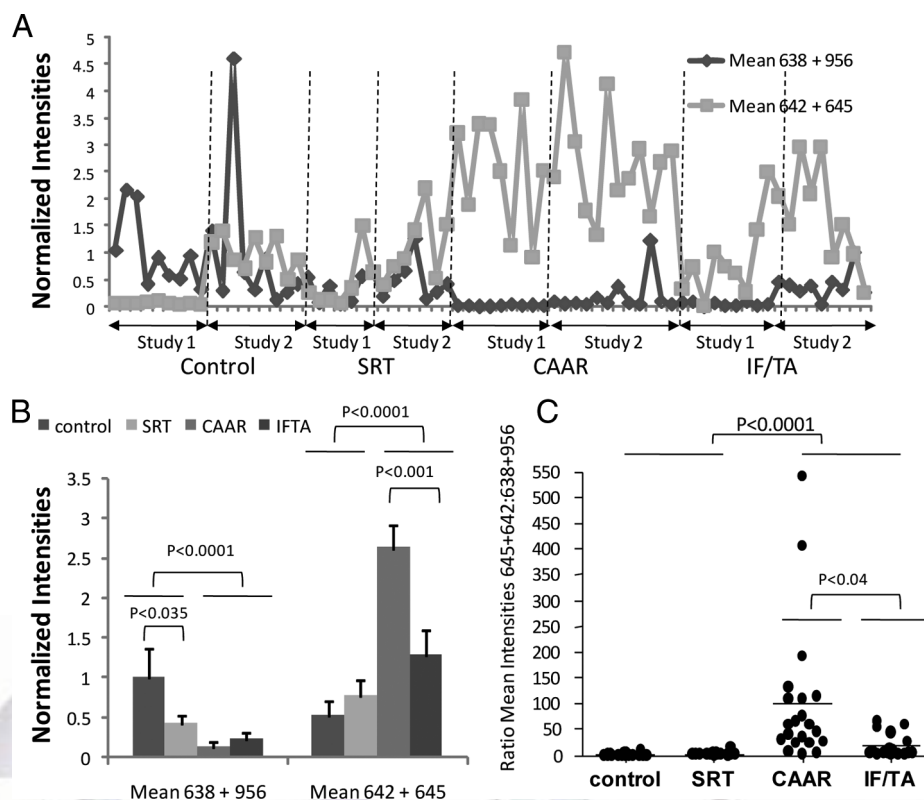
AQ: S

peptides but one, which could be assigned as potential biomarker (data not shown). Thus, our data demonstrate that a specific combination of peptides derived from uromodulin and bradykinin represents a potential excellent and specific biomarker cluster that reflects kidney health. Measurement of this cluster of biomarkers could potentially differentiate between patients with CAD and those with a stable transplant, a finding of great clinical interest.

Identification of Urinary Molecular Features for the Classification of CAD into Clinical Subtypes—The peptides discussed above, although useful for the diagnosis of CAD, could not further discriminate between the two CAD groups, namely CAAR and IF/TA groups. We therefore mined our data further by considering the ions that could be detected but for which it was not possible to derive sufficient structural information for identification. These ions are likely to be peptides, but they could also be carbohydrates or other organic bases. Fig. 5B shows that ions at m/z 645.59 and m/z 642.61 were significantly more abundant in CAAR patients than in IF/TA (4.4–2.7-fold change) and SRT (5.3–14.6-fold change) specimens, allowing us to differentiate between the two different

Peptidomics in Kidney Transplantation

FIG. 6. A combination of biomarkers better discriminates CAD and controls subjects and classifies chronic allograft dysfunction into clinical subtypes. *A*, the mean intensities of the molecular ions with the indicated m/z values were plotted for each of the 39 patients and 32 controls in training (*Study 1*) and validation (*Study 2*) experiments. *B*, these means were statistically different in CAD and control subjects. Graphs represent mean \pm S.E. of the means shown in *A* with statistical significances shown for pairwise comparisons. Kruskal-Wallis analysis returned a $p < 0.0001$. *C*, ratio of the means of 638–956 to 642–645 is also a useful indicator of CAD. Values were obtained by obtaining the ratio of the values shown in *A* for each patient and were statically significant by Kruskal-Wallis test at $p < 0.0001$. p values obtained by Dunn's multiple comparison tests are shown in the figure.



forms of CAD. These biomarkers correctly identified 100% of the pure IF/TA group and 90% (nine of 10) of the CAAR patients.

Quantitative analysis of these ions in individual patients indicated that these were consistently more abundant in CAAR patients than in the IF/TA group both when they were considered in isolation (Fig. 5B) and when the mean of these potential biomarkers was calculated (Fig. 5D). Indeed the mean expression of ions at m/z 645.59 and m/z 642.61 was greater in 10 of 10 CAAR patients than in six of seven patients in the IF/TA group (Fig. 5D). These results indicate that the mean expression of these two ions can discriminate between patients with different forms of CAD.

Investigation Potential CAD Biomarkers in a Validation Patient Population—To verify our training set findings in a second validation set of samples, we analyzed urinary peptides consisting of 21 CAD patients and 18 controls (Fig. 6A). As with the initial experiment (Fig. 5), the data of this validation study indicated that the mean intensities of two uromodulin ions at m/z 638 and m/z 956 were statistically significantly higher in the control groups than in the CAD groups (Fig. 6B). The ions at m/z 642 and m/z 645 could also distinguish between CAD and control subjects ($p < 0.0001$, $n = 39$ CAD and 32 controls; Fig. 6B), and in addition, their intensities were significantly higher in CAAR than in the IF/TA subtype ($p < 0.0004$, $n = 20$ CAAR and 19 IF/TA).

This combination of biomarkers can assist in the diagnosis of CAD as indicated in Fig. 6 (A and C), which shows that low

intensities of ions at m/z 638 and 956 together with a high concentration of ions at m/z 642 and 645 are characteristic of CAD subtypes. The ratios of these two groups of biomarkers were also of diagnostic value (Fig. 6D).

Verification Using an Orthogonal Technique—We investigated whether MRM could be used to monitor and validate the putative biomarkers found in the experiments shown above. Although MRM is often performed in triple quadrupole instruments because of their increased sensitivities relative to hybrid instruments such as Q-TOF mass spectrometers, performing peptide MRM in Q-TOF mass spectrometers has the advantage that it is possible to add the ionic intensities of peptide fragments produced during CID MS/MS, which splits the signal of the peptide into several fragments and thus compromises sensitivity. Thus we designed experiments in which the Q1 of the Q-TOF selects for the m/z of the peptide to be monitored with all the fragments being analyzed and recorded by TOF MS. This is exemplified with m/z 638.03 in Fig. 7A, which shows that several ions had m/z 638 in a urine analysis over a 10-min gradient. We then obtained XICs of fragment ions produced by CID MS/MS. As shown in Fig. 7B (and as expected), adding four of these fragment ions produced peaks with greater signal to noise ratios (S/N) than when only one fragment was monitored as when using triple quadrupole. Monitoring the addition of several fragments could in principle result in a decrease in specificity because nearly coeluting species could produce isobaric fragment ions upon CID. This po-

Peptidomics in Kidney Transplantation

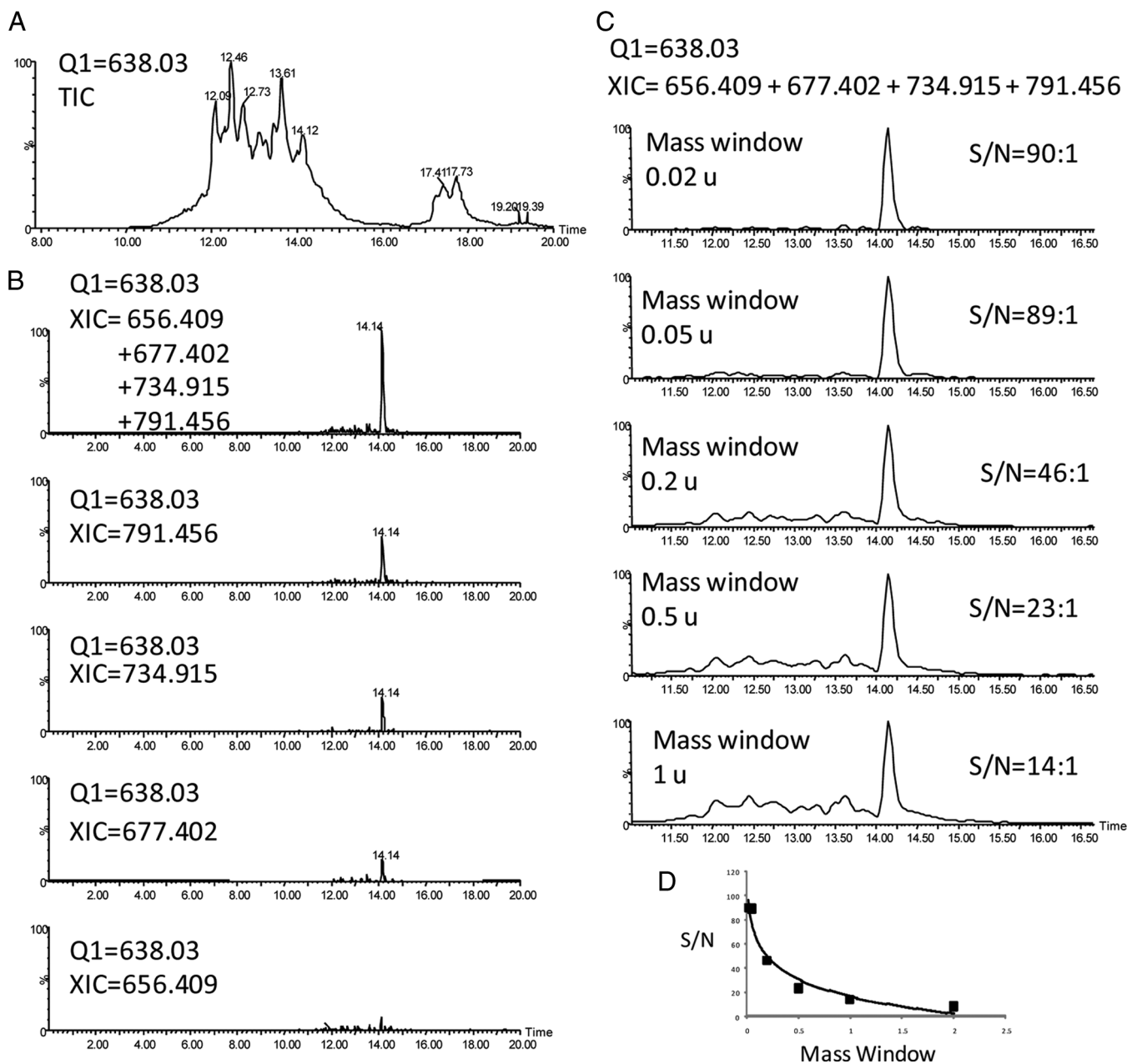


FIG. 7. Targeted quantification and validation of potential biomarkers by pseudoMRM LC-MS/MS in a Q-TOF mass spectrometer. A, total ion chromatogram (TIC) produced when Q1 was set to transmit m/z 638 only in an LC-MS/MS analysis of urine. B, XICs of the indicated fragment ions produced upon CID of uromodulin peptide with m/z 638.03. C, XICs as in B with different mass window settings. D, plot of S/N as a function of XIC mass window.

tential problem was minimized by using narrow mass windows when constructing the XICs of fragment ions. Thus, as Fig. 7C shows, a mass window of 0.02 mass unit (u) produced a peak with S/N = 90, whereas allowing a 1-u mass window produced a peak of just S/N = 14. Fig. 7D indicates that at a window of 0.05 u the S/N enhancement by narrowing mass windows reached a plateau.

Using this pseudoMRM approach we were able to obtain specific and “clean” transitions for five of the potential biomarkers identified above (Fig. 8). These techniques were then

used to monitor the amounts of these biomarkers in a representative series of samples of the validation group. These results, shown in Fig. 9, confirmed that ions at m/z 638.03, m/z 642.61, and m/z 645.61 are promising potential biomarkers of CAD and validated the LC-MS approach (compare graphs in Figs. 5 and 9, bearing in mind that the LC-MS approach in Fig. 5 provides relative quantification whereas the LC-MS/MS approach in Fig. 9 provides a readout in absolute units).

MS/MS Sequencing of Potential Biomarkers of CAD—The potential biomarker ions at m/z 638 and 956 were triply and

AQ: V

F9

Renal Rejection

Control Subject

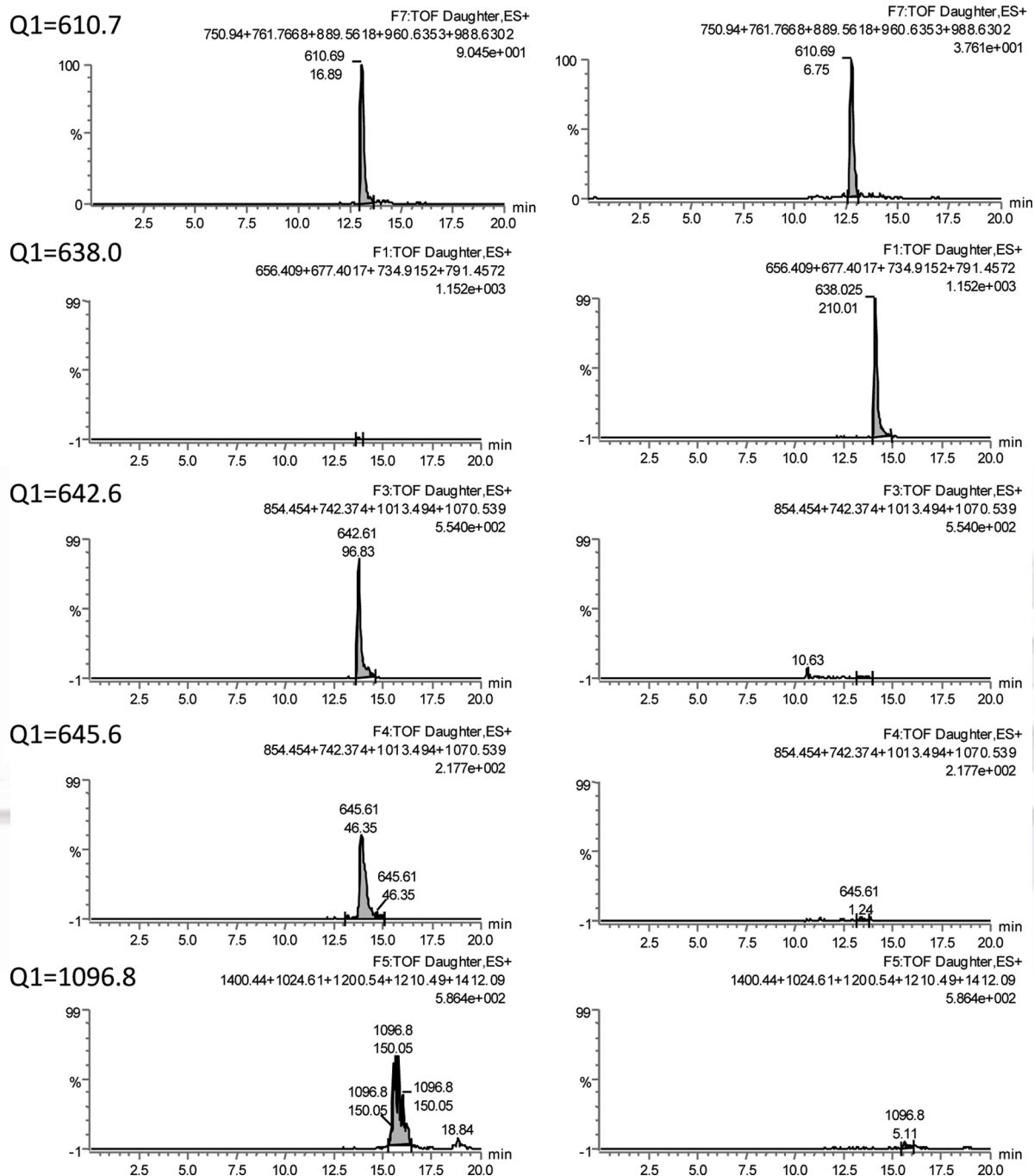


FIG. 8. Examples of chromatograms for each of the ions monitored by targeted LC-MS/MS. The m/z values of the parent ions monitored are shown on the left. The sum of fragments that were then added in XICs are shown in the right top corner of each chromatogram.

AQ: QQ

AQ: W

doubly charged versions of the same peptide and were identified by Mascot searchers as being derived from uromodulin. This identity was confirmed by manual assignment of all the fragment ions in the MS/MS spectrum (Fig. 10A). Ions at m/z 645 and m/z 642 had four charges, and they are related in that

F10

many of their fragment ions were common between the two species (supplemental Fig. 1). Although the MS/MS spectra were of good quality, they did not return a positive match by Mascot or Protein Prospector searches against NCBI or Swiss-Prot databases. Manual interpretation produced a par-

ZSI

Peptidomics in Kidney Transplantation

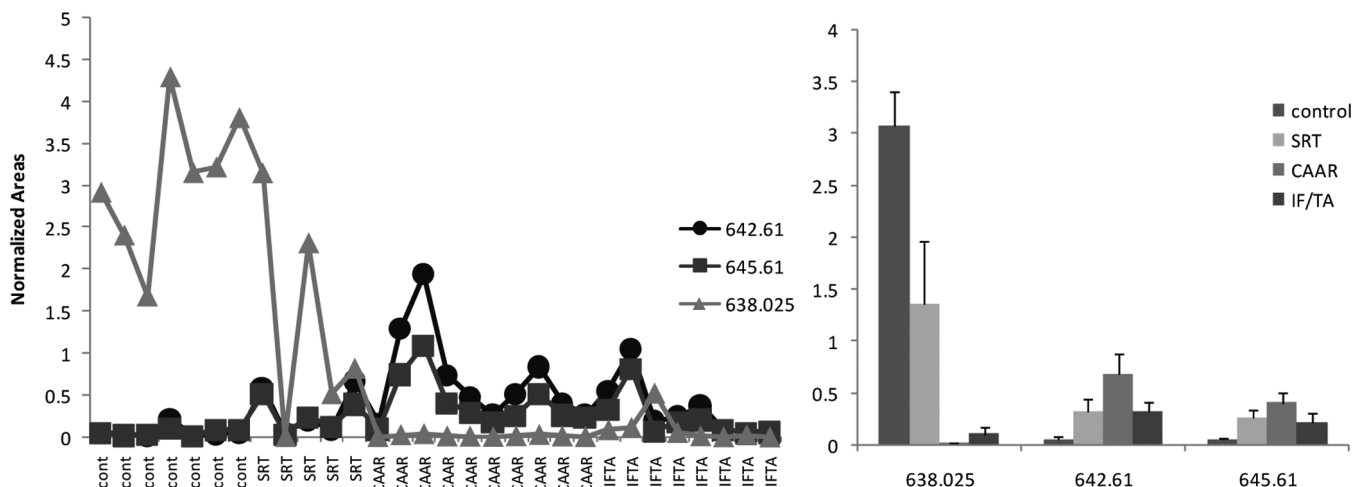


FIG. 9. **Results of targeted LC-MS/MS experiment.** Results of urine analysis, as obtained by the pseudoMRM approach shown in Figs. 7 and 8, are shown in the *left* graph for individual samples. The *right* graph shows the mean \pm S.D. of data on the *left* grouped by phenotypes.

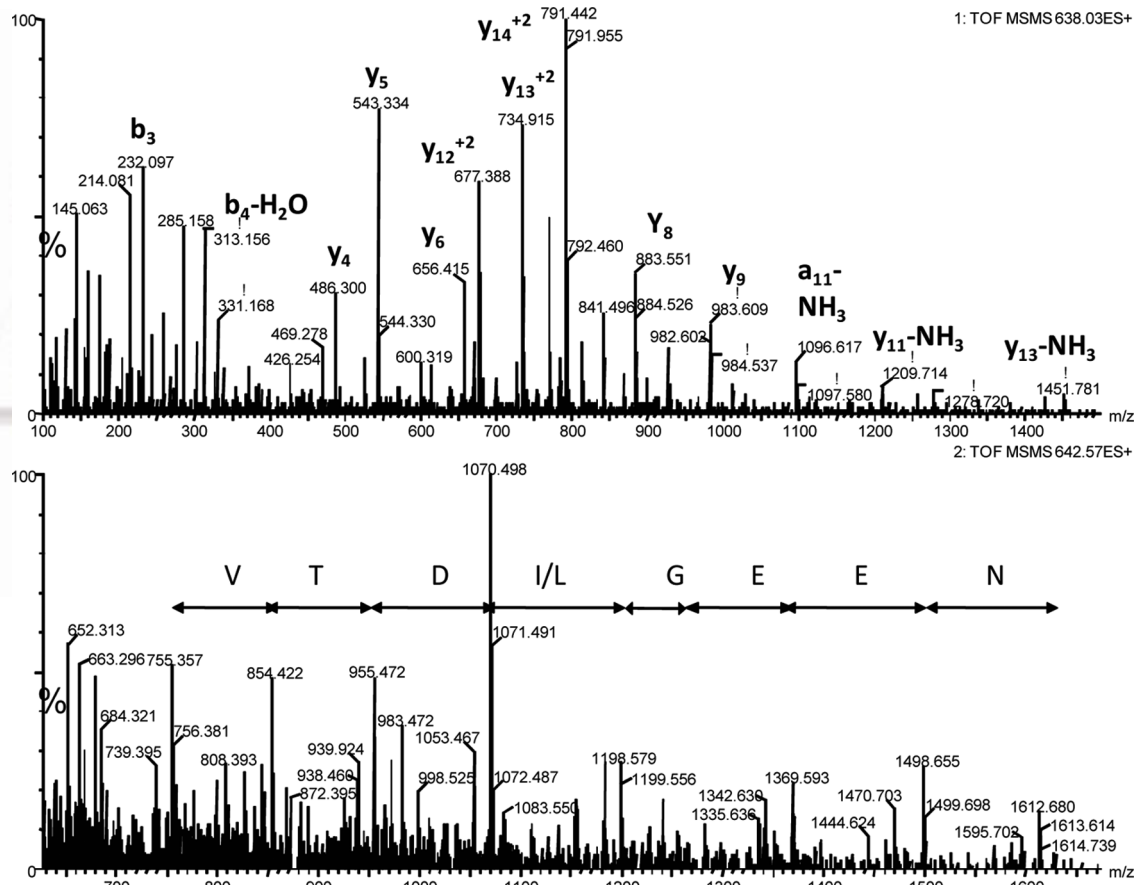


FIG. 10. **MS/MS spectra of potential biomarkers.** The *top* panel shows an MS/MS spectrum of m/z 638.03 (3+) that matched to a uromodulin fragment with sequence SGSVIDQSRVNLNLPITR. The *bottom* panel shows a spectrum of m/z 642.3 (4+) that did not produce a positive match by database searches. A potential amino acid sequence is shown.

AQ: SS

AQ: X, ZSI

tial putative sequence (VTD(I/L)GEEN; Fig. 10B and [supplemental](#) Fig. 2) that did not match any entry in actualized NCBI and Swiss-Prot protein databases.

DISCUSSION

Despite its limited initial success, MS still offers great potential for biomarker discovery. The most popular techniques

for biomarker discovery among clinicians are single spectrum profiling techniques such as SELDI-TOF MS and MALDI-TOF MS, both of which have been successfully used to identify potential biomarkers (32).

However, there is little overlap between the biomarkers identified by these techniques in different laboratories, and those abundant and reproducible features are unspecific. Because of their limited dynamic range, these methods may not be directly interfaced with MS/MS instruments for sequencing useful biomarkers for diagnosis. This contrasts with the reproducibility and dynamic range of hyphenated techniques such as LC-MS and capillary electrophoresis-MS with the former being routinely used in diagnostic and forensic applications (33). Because of its larger dynamic range and depth of analysis, LC-MS can detect and quantify hundreds/thousands of polypeptides in biological fluids (6), and the use of this technique for the analysis of the urinary proteome and peptidome is well documented (10–13), a fact of great interest because of the potential of urine as a non-invasive source of biomarkers. However, because of their recent development, the use of quantitative LC-MS for comprehensive quantification of polypeptides in urine for biomarker discovery is not significant.

Here we used a label-free LC-MS approach for the discovery of urine biomarkers able to diagnose CAD, the main cause of kidney transplant loss. Previous studies (11, 12) demonstrated that urine contains a large number of small peptides; these urinary components may represent a rich source of biomarkers that is not fully explored. For this reason and because we also wanted to avoid the variability that a proteolytic step may introduce to our analyses, we chose not to digest the sample prior to LC-MS analysis. We also chose to perform a targeted quantification approach because we reasoned that this would lead to less variability and decided to quantify all the entries in the redundant list of >6000 multiply charged ions that we identified across samples. We did not initially filter this list because the redundancy of quantitative data should not have adverse effects on the outcome of the analysis and may, in some cases, add confidence to the results and help to rule out potential artifacts.

By performing this targeted approach by LC-MS, we circumvented problems with lengthy duty cycles imposed when quantifying by LC-MS/MS (quantification of >2000 peptides in a single 30-min gradient run, as in the present study, by multiple reaction monitoring is not possible even with the new generation of fast scan instruments), which can lead to undersampling (as in data-dependent experiments needed to perform quantitative strategies based on isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) and similar labeling reagents); thus the need for extensive separation was obviated in the present study. As a result, we reduced the LC-MS run time (total cycle) to about 45 min per sample, which allowed us to have a throughput of about 30 samples per day

per LC-MS system. The LC-MS run time could be shortened further for studies where fewer analytes need to be followed for validation purposes as in the pseudoMRM approach presented here (Figs. 7 and 8). The precision and accuracy of this LC-MS method has been demonstrated before (4). In addition spiking experiments (Fig. 2) and correlation to targeted MRM (Fig. 9) showed that this LC-MS technique provides adequate quantitation (CVs of about 10–15% on average).

There are several urine potential biomarkers for CAD reported in the literature that were identified by radioimmunoassay or gene expression analysis (34, 35), but to our knowledge, this is the first report on the use of this noninvasive peptidomics approach for the identification of polypeptide biomarkers in urine of CAD patients. Indeed using this approach we identified specific peptides derived from uromodulin and kinins (bradykinin) as specific biomarkers of a healthy kidney whose presence could be used with statistically significant confidence to discriminate between CAD patients and unaffected individuals. Of special interest are those that can distinguish between SRT and CAD specimens. Moreover MRM experiments monitoring the putative biomarkers found in the training sample set confirmed that the best discriminatory markers were the combination of ions at m/z 638.0 and m/z 642.5. Thus high 642.5 and low 638.0 is characteristic of CAD urine and can also discriminate CAD subtypes.

The ability of discriminating between CAD subtypes is another important outcome of this study because CAAR (a specific form of CAD) has a unique pathogenesis that distinguishes it from other chronic pathologic conditions of kidney allografts. Two features highlight the importance of an early diagnosis of this disease: CAAR is associated with very poor allograft survival, and CAAR is the first example of a pathologic entity distinct from the generic and nonspecific histological forms of CAD such as IF/TA (36). The ability of easily and non-invasively distinguishing these two forms of CAD opens new opportunities for further clinical studies and for assessing clinical outcomes based on specific therapeutic regimens.

Effective strategies to prevent renal function deterioration in kidney transplant patients focus on the early detection and treatment of patients developing CAD. Specific and sensitive biomarkers are needed to identify patients at risk of developing CAD or initial lesions that do not show changes in the current available biomarkers such as serum creatinine or GFP. This feature is of particular importance because these non-invasive biomarkers have been proved to have poor predictive value (most confidence intervals included 0.5, indicating no predictive ability) for 10 individual histological measurements (Banff 97 scores) and the Chronic Allograft Damage Index. Thus, serum creatinine and GFR have a limited clinical role in predicting the early histopathological changes that precede CAD and should not be used for this purpose (37).

Renal biopsy has proved to be an effective diagnostic method for CAD; nevertheless the implied risk for the patients

AQ: Y

AQ: AA

AQ: Z

Peptidomics in Kidney Transplantation

limits its use and, by implication, its success. There is thus an urgent need for a simple and non-invasive method of risk assessment that can be applied to all renal transplant patients to identify those few at greatest risk of CAD development. As the transplant community continues to struggle with the challenge of reducing late allograft loss due to CAD, the new biomarkers identified in this study will undoubtedly emerge as surrogates to develop a renal risk score applicable to a more general population of patients with a renal allograft.

Uromodulin is exclusively expressed in the kidney and constitutes the most abundant protein in human urine. The exact physiological role of uromodulin, however, remains to be elucidated (38). Nevertheless it has been proposed that this protein is involved in the development of cast nephropathy, in the formation of renal stones, in immunologic defense in the kidney, and in the modulation of systemic immunologic events (39). More than 2 decades ago, in a study of renal allografts with cellular acute rejection, extratubular uromodulin was identified in 63.6% of the specimens, representing 76.1% of the patients whose tissues were examined (40). In the kidney transplantation field, uromodulin has been suggested as being suitable for monitoring the functional state of transplanted kidneys. In a very preliminary study from the late 1990s (41), the urinary uromodulin after uninephrectomy and transplantation among relatives was determined by ELIAS SYNELISA-uromodulin immunoassay to study the influence of the acute reduction in renal mass on the excretion of this protein; uninephrectomy in healthy man was associated with a marked increase of around 40% in the excretion of uromodulin from the kidney that remained in the donor. In the kidney that was transplanted, the uromodulin excretion rate was unchanged. The uromodulin excretion rate was correlated with GFR, but mechanisms underlying this association were unknown as uromodulin does not undergo glomerular filtration (41, 42). The present study indicates that the best biomarker may not be full-length uromodulin and has identified specific peptides derived from uromodulin in donors and recipients of kidney transplantation more suitable for monitoring the functional state of transplanted kidneys. Full-length uromodulin protein forms oligomers that tend to precipitate (43), and therefore monitoring the full-length protein in urine is prone to artifacts. In contrast, small peptides are soluble, easy to handle, and amenable to detection by different biophysical and immunological techniques.

Besides the immunologically mediated damage on the graft, the intrarenal renin-angiotensin system (RAS) is viewed as an additional mechanism in the development and progression of CAD (44). RAS blocking agents efficiently control post-transplant hypertension and are useful to reduce proteinuria and partially exert their beneficial cardiovascular effects by potentiating endogenous kinins (45–47). However, because of the nature of the studies and in particular the duration of treatment and the numbers of patients

evaluated, we cannot establish whether these interventions have a long term beneficial effect on cardiovascular outcomes and the prevention of progressive allograft dysfunction. Moreover the optimal approach for the provision of more complete RAS blockade has yet to be identified (48). From this point of view, peptides derived from kinins (in particular bradykinin) could be evaluated in the future not only for the diagnosis of CAD but also as a tracing biomarker of the renoprotector effects of RAS blockage and in the progression of CAD.

In view of the complex relationship among clinical and biological CAD factors and between early histopathological changes and graft outcome, the identification of non-invasive biomarkers of CAD stages and subtypes is imperative to improve long term graft survival. The biomarkers reported here, by themselves or in combination, could form the basis of a urine test for the early diagnosis of CAD and its subtypes without the need for invasive biopsies. This will facilitate a more rapid introduction of targeted and personalized immunosuppressive regimens to improve long term graft outcomes. Confirmation of these results in larger scale cross-center studies should lead to a significant improvement in techniques for monitoring renal transplant progression.

Acknowledgments—We are grateful to John Timms for critical reading of the manuscript, to Robert Chalkley for help with MS/MS interpretation, to Bart Vanhaesebroeck for support, and to Federico Oppenheimer for clinical advice.

* This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias Grants FIS 03/0557 and FIS 06/1222, by an Emili Letang Fellowship award (to L. F. Q.) from Hospital Clinic in Barcelona, and by the Bart's and the London Charity (to P. R. C. and M. P. A.).

§ The on-line version of this article (available at <http://www.mcponline.org>) contains supplemental material.

¶ To whom correspondence regarding clinical queries should be addressed: Servicio de Nefrología y Trasplante renal, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel. and Fax: 34-3-2275444; E-mail: lfquinta@clinic.ub.es.

** To whom correspondence regarding biotechnological questions should be addressed. E-mail: p.cutillas@qmul.ac.uk.

REFERENCES

1. Cox, J., and Mann, M. (2007) Is proteomics the new genomics? *Cell* **130**, 395–398
2. Norden, A. G., Rodriguez-Cutillas, P., and Unwin, R. J. (2007) Clinical urinary peptidomics: learning to walk before we can run. *Clin. Chem.* **53**, 375–376
3. Rifai, N., Gillette, M. A., and Carr, S. A. (2006) Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat. Biotechnol.* **24**, 971–983
4. Cutillas, P. R., and Vanhaesebroeck, B. (2007) Quantitative profile of five murine core proteomes using label-free functional proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1560–1573
5. Silva, J. C., Gorenstein, M. V., Li, G. Z., Vissers, J. P., and Geromanos, S. J. (2006) Absolute quantification of proteins by LCMS^E: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 144–156
6. Qian, W. J., Jacobs, J. M., Liu, T., Camp, D. G., 2nd, and Smith, R. D. (2006) Advances and challenges in liquid chromatography-mass spectrometry-based proteomics profiling for clinical applications. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 1727–1744
7. Washburn, M. P., Wolters, D., and Yates, J. R., 3rd (2001) Large-scale

AQ: BB

AQ: CC

ZSI

AQ: EE

Peptidomics in Kidney Transplantation

analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19**, 242–247

8. Constantopoulos, T. L., Jackson, G. S., and Enke, C. G. (1999) Effects of salt concentration on analyte response using electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 625–634
9. Smith, R. D., Tang, K., and Shen, Y. (2006) Ultra-sensitive and quantitative characterization of proteomes. *Mol. Biosyst.* **2**, 221–230
10. Spahr, C. S., Davis, M. T., McGinley, M. D., Robinson, J. H., Bures, E. J., Beierle, J., Mort, J., Courchesne, P. L., Chen, K., Wahl, R. C., Yu, W., Luethy, R., and Patterson, S. D. (2001) Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. I. Profiling an unfractionated tryptic digest. *Proteomics* **1**, 93–107
11. Cutillas, P. R., Norden, A. G., Cramer, R., Burlingame, A. L., and Unwin, R. J. (2003) Detection and analysis of urinary peptides by on-line liquid chromatography and mass spectrometry: application to patients with renal Fanconi syndrome. *Clin. Sci.* **104**, 483–490
12. Cutillas, P. R., Norden, A. G., Cramer, R., Burlingame, A. L., and Unwin, R. J. (2004) Urinary proteomics of renal Fanconi syndrome. *Contrib. Nephrol.* **141**, 155–169
13. Adachi, J., Kumar, C., Zhang, Y., Olsen, J. V., and Mann, M. (2006) The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol.* **7**, R80
14. Ong, S. E., and Mann, M. (2005) Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 252–262
15. Ow, S. Y., Cardona, T., Taton, A., Magnuson, A., Lindblad, P., Stensjö, K., and Wright, P. C. (2008) Quantitative shotgun proteomics of enriched heterocysts from *Nostoc* sp. PCC 7120 using 8-plex isobaric peptide tags. *J. Proteome Res.* **7**, 1615–1628
16. Cutillas, P. R., Geering, B., Waterfield, M. D., and Vanhaesebroeck, B. (2005) Quantification of gel-separated proteins and their phosphorylation sites by LC-MS using unlabeled internal standards: analysis of phospho-protein dynamics in a B cell lymphoma cell line. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 1038–1051
17. Turck, C. W., Falick, A. M., Kowalak, J. A., Lane, W. S., Lilley, K. S., Phinney, B. S., Weintraub, S. T., Witkowska, H. E., and Yates, N. A. (2007) The Association of Biomolecular Resource Facilities Proteomics Research Group Study: relative protein quantitation. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1291–1298
18. Collins, A. J., Kasiske, B., Herzog, C., Chen, S. C., Everson, S., Constantini, E., Grimm, R., McBean, M., Xue, J., Chavers, B., Matas, A., Manning, W., Louis, T., Pan, W., Liu, J., Li, S., Roberts, T., Dalleska, F., Snyder, J., Ebben, J., Frazier, E., Sheets, D., Johnson, R., Li, S., Dunning, S., Berrini, D., Guo, H., Solid, C., Arko, C., Daniels, F., Wang, X., Forrest, B., Gilbertson, D., St Peter, W., Frederick, P., Eggers, P., and Agodoa, L. (2003) Excerpts from the United States Renal Data System 2003 Annual Data Report: atlas of end-stage renal disease in the United States. *Am. J. Kidney Dis.* **42**, Suppl. 5, A5–7, S1–230
19. Wolfe, R. A., Ashby, V. B., Milford, E. L., Ojo, A. O., Ettenger, R. E., Agodoa, L. Y., Held, P. J., and Port, F. K. (1999) Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N. Engl. J. Med.* **341**, 1725–1730
20. Paul, L. C. (1999) Chronic allograft nephropathy: an update. *Kidney Int.* **56**, 783–793
21. Laupacis, A., Keown, P., Pus, N., Krueger, H., Ferguson, B., Wong, C., and Muirhead, N. (1996) A study of the quality of life and cost-utility of renal transplantation. *Kidney Int.* **50**, 235–242
22. Nankivell, B. J., Borrows, R. J., Fung, C. L., O'Connell, P. J., Allen, R. D., and Chapman, J. R., Jr. (2003) The natural history of chronic allograft nephropathy. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2326–2333
23. Beckingham, I. J., Nicholson, M. L., and Bell, P. R. (1994) Analysis of factors associated complications following renal transplant needle core biopsy. *Br. J. Urol.* **73**, 13–15
24. Rush, D. N., Nickerson, P., Jeffery, J. R., McKenna, R. M., Grimm, P. C., and Gough, J. (1998) Protocol biopsies in renal transplantation: research tool or clinically useful? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **7**, 691–694
25. Nankivell, B. J., and Chapman, J. R. (2006) Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* **81**, 643–654
26. Solez, K., Colvin, R. B., Racusen, L. C., Sis, B., Halloran, P. F., Birk, P. E., Campbell, P. M., Cascalho, M., Collins, A. B., Demetris, A. J., Drachenberg, C. B., Gibson, I. W., Grimm, P. C., Haas, M., Lerut, E., Liapis, H., Mannon, R. B., Marcus, P. B., Mengel, M., Mihatsch, M. J., Nankivell, B. J., Nicleleit, V., Papadimitriou, J. C., Platt, J. L., Randhawa, P., Roberts, I., Salinas-Madruga, L., Salomon, D. R., Seron, D., Sheaff, M., and Weening, J. J. (2007) Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am. J. Transplant.* **7**, 518–526
27. Racusen, L. C., Solez, K., Colvin, R. B., Bonsib, S. M., Castro, M. C., Cavallo, T., Croker, B. P., Demetris, A. J., Drachenberg, C. B., Fogo, A. B., Furness, P., Gaber, L. W., Gibson, I. W., Glotz, D., Goldberg, J. C., Grande, J., Halloran, P. F., Hansen, H. E., Hartley, B., Hayry, P. J., Hill, C. M., Hoffman, E. O., Hunsicker, L. G., Lindblad, A. S., Marcussen, N., Mihatsch, M. J., Nadasdy, T., Nickerson, P., Olsen, T. S., Papadimitriou, J. C., Randhawa, P. S., Rayner, D. C., Roberts, I., Rose, S., Rush, D., Salinas-Madruga, L., Salomon, D. R., Sund, S., Taskinen, E., Trpkov, K., and Yamaguchi, Y. (1999) The Banff 97 working classification for renal allograft pathology. *Kidney Int.* **55**, 713–723
28. Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14863–14868
29. Zweig, M. H., and Campbell, G. (1993) Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* **39**, 561–577
30. Wilm, M. S., and Mann, M. (1994) Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **136**, 167–180
31. Gangl, E. T., Annan, M. M., Spooner, N., and Vouros, P. (2001) Reduction of signal suppression effects in ESI-MS using a nanosplitting device. *Anal. Chem.* **73**, 5635–5644
32. Quintana, L. F., Solé-Gonzalez, A., Kalko, S. G., Bañon-Maneus, E., Solé, M., Diekmann, F., Gutierrez-Dalmau, A., Abian, J., and Campistol, J. M. (2009) Urine proteomics to detect biomarkers for chronic allograft dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 428–435
33. Maurer, H. H. (2006) Hyphenated mass spectrometric techniques-indispensable tools in clinical and forensic toxicology and in doping control. *J. Mass Spectrom.* **41**, 1399–1413
34. Teppo, A. M., Honkanen, E., Finne, P., Törnroth, T., and Grönhagen-Riska, C. (2004) Increased urinary excretion of alpha1-microglobulin at 6 months after transplantation is associated with urinary excretion of transforming growth factor-beta1 and indicates poor long-term renal outcome. *Transplantation* **78**, 719–724
35. Mas, V., Maluf, D., Archer, K., Yanek, K., Mas, L., King, A., Gibney, E., Massey, D., Cotterell, A., Fisher, R., and Posner, M. (2007) Establishing the molecular pathways involved in chronic allograft nephropathy for testing new noninvasive diagnostic markers. *Transplantation* **83**, 448–457
36. Cosio, F. G., Grande, J. P., Wadei, H., Larson, T. S., Griffin, M. D., and Stegall, M. D. (2005) Predicting subsequent decline in kidney allograft function from early surveillance biopsies. *Am. J. Transplant.* **5**, 2464–2472
37. Yilmaz, S., Isik, I., Afrouzian, M., Monroy, M., Sar, A., Benediktsson, H., and McLaughlin, K. (2007) Evaluating the accuracy of functional biomarkers for detecting histological changes in chronic allograft nephropathy. *Transpl. Int.* **20**, 608–615
38. Hoyer, J. R., and Seiler, M. W. (1979) Pathophysiology of Tamm-Horsfall protein. *Kidney Int.* **16**, 279–289
39. Kokot, F., and Dulawa, J. (2000) Tamm-Horsfall protein updated. *Nephron* **85**, 97–102
40. Howie, A. J., and Brewer, D. B. (1983) Extra-tubular deposits of Tamm-Horsfall protein in renal allografts. *J. Pathol.* **139**, 193–206
41. Torffvit, O., Kamper, A. L., and Strandgaard, S. (1997) Tamm-Horsfall protein in urine after uninephrectomy/transplantation in kidney donors and their recipients. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **31**, 555–559
42. Kaden, J., Groth, J., May, G., and Liedvogel, B. (1994) Urinary Tamm-Horsfall protein as a marker of renal transplant function. *Urol. Res.* **22**, 131–136
43. Beshensky, A. M., Wesson, J. A., Worcester, E. M., Sorokina, E. J., Snyder, C. J., and Kleinman, J. G. (2001) Effects of urinary macromolecules on hydroxyapatite crystal formation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 2108–2116
44. Iñigo, P., Campistol, J. M., Lario, S., Piera, C., Campos, B., Bescós, M., Oppenheimer, F., and Rivera, F. (2001) Effects of losartan and amlodipine on intrarenal hemodynamics and TGF-beta(1) plasma levels in a

AQ: GG

AQ: HH

AQ: FF

Peptidomics in Kidney Transplantation

AQ: II

- crossover trial in renal transplant recipients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 822–827
45. Madeddu, P., Emanuelli, C., and El-Dahr, S. (2007) Mechanisms of disease: the tissue kallikrein-kinin system in hypertension and vascular remodeling. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* **3**, 208–221
46. Phipps, J. A., and Feener, E. P. (2008) The kallikrein-kinin system in diabetic retinopathy: lessons for the kidney. *Kidney Int.* **73**, 1114–1119
47. Bakris, G. L. (2008) Slowing nephropathy progression: focus on proteinuria reduction. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **3**, Suppl. 1, S3–10
48. Taal, M. W., and Brenner, B. M. (2008) Renal risk scores: progress and prospects. *Kidney Int.* **73**, 1216–1219
49. National Kidney Foundation (2002) K/DOQI™ clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am. J. Kidney Dis.* **39**, 2 Suppl. 1, S1–266

AQ: JJ



Patente

Healthy Kidney Biomarkers PCT/EP2008/060062. European Patent Office, The Hague



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for the processing of an international application according to the Patent Cooperation Treaty as follows:

Submission number	424365	
PCT application number	PCT/EP2008/060062	
Date of receipt	31 July 2008	
Receiving Office	European Patent Office, The Hague	
Your reference	20080470	
Applicant	QUEEN MARY AND WESTFIELD COLLEGE, UNIVERSITY OF LONDON	
Number of applicants	8	
Country	GB	
Title	HEALTHY KIDNEY BIOMARKERS	
Documents submitted	eolf-pkda.xml eolf-appb.xml eolf-fees.xml pct101.GML eolf-abst.txt pct101.IWO pct101u.gml	eolf-requ.xml eolf-seql.pdf (5 p.) eolf-vlog.xml eolf-othd-000001.pdf (23 p.) eolf-appb-P000001.pdf (5 p.) Pct101.PDF (5 p.) referenc.inf
Submitted by	CN=R, Toquero Martinez 2426,O=Herrero & Asociados,C=ES	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	31 July 2008, 13:13:41 (CEST)	
Digest	2C:10:63:6F:10:27:A8:74:0A:E9:32:DC:FD:EE:4E:2A:70:EF:2E:50	

/European Patent Office/

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT Online Filing Version 3.5.000.193 MT/FOP 20020701/0.20.5.9
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	European Patent Office (EPO) (RO/EP)
0-7	Applicant's or agent's file reference	20080470
I	Title of Invention	HEALTHY KIDNEY BIOMARKERS
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	QUEEN MARY AND WESTFIELD COLLEGE, UNIVERSITY OF LONDON
II-5	Address	Queen's Building, Mile End Road, London E1 4NS United Kingdom
II-6	State of nationality	GB
II-7	State of residence	GB
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant only
III-1-2	Applicant for	all designated States except US
III-1-4	Name	HOSPITAL CLÍNIC I PROVINCIAL DE BARCELONA
III-1-5	Address	c/ Villarroel 170 08036 BARCELONA Spain
III-1-6	State of nationality	ES
III-1-7	State of residence	ES

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant only
III-2-2	Applicant for	all designated States except US
III-2-4	Name	INSTITUT DE INVESTIGACIONS BIOMEDIQUES AUGUST PI I SUNYER
III-2-5	Address	C/ Villarroel 170 08036 BARCELONA Spain
III-2-6	State of nationality	ES
III-2-7	State of residence	ES
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	QUINTANA PORRAS, Luis, F.
III-3-5	Address	HOSPITAL CLÍNIC I PROVINCIAL DE BARCELONA c/ Villarroel 170 08036 BARCELONA Spain
III-3-6	State of nationality	ES
III-3-7	State of residence	ES
III-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	SOLE GONZALEZ, Amanda
III-4-5	Address	INSTITUT DE INVESTIGACIONS BIOMEDIQUES AUGUST PI I SUNYER C/ Villarroel 170 08036 BARCELONA Spain
III-4-6	State of nationality	ES
III-4-7	State of residence	ES

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

III-5	Applicant and/or inventor	
III-5-1	This person is	applicant and inventor
III-5-2	Applicant for	US only
III-5-4	Name (LAST, First)	BAÑÓN - MANEUS, Elisenda
III-5-5	Address	INSTITUT DE INVESTIGACIONS BIOMEDIQUES AUGUST PI I SUNYER C/ Villarroel 170 08036 BARCELONA Spain
III-5-6	State of nationality	ES
III-5-7	State of residence	ES
III-6	Applicant and/or inventor	
III-6-1	This person is	applicant and inventor
III-6-2	Applicant for	US only
III-6-4	Name (LAST, First)	CAMPISTOL, Josep, M
III-6-5	Address	HOSPITAL CLÍNIC I PROVINCIAL DE BARCELONA c/ Villarroel 170 08036 BARCELONA Spain
III-6-6	State of nationality	ES
III-6-7	State of residence	ES
III-7	Applicant and/or inventor	
III-7-1	This person is	applicant and inventor
III-7-2	Applicant for	US only
III-7-4	Name (LAST, First)	RODRIGUEZ CUTILLAS, Pedro
III-7-5	Address	QUEEN MARY AND WESTFIELD COLLEGE, UNIVERSITY OF LONDON Queen's Building, Mile End Road, LONDON E1 4NS United Kingdom
III-7-6	State of nationality	ES
III-7-7	State of residence	GB

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent	
IV-1-1	Name (LAST, First)	CARPINTERO LOPEZ, Francisco	
IV-1-2	Address	Herrero & Asociados, S.L. Alcala, 35 28014 MADRID Spain	
IV-1-3	Telephone No.	34915227420	
IV-1-4	Facsimile No.	34915226249	
V	DESIGNATIONS		
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.		
VI-1	Priority Claim	NONE	
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	5	✓
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	20	✓
IX-3	Claims	2	✓
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	5	✓
IX-7a	Sub-total number of sheets	33	
IX-6a	Sequence listing part of description	5	✓
IX-7	TOTAL	38	
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	-	✓
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	-
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative	/CARPINTERO LOPEZ, Francisco _____/	
X-1-1	Name (LAST, First)	CARPINTERO LOPEZ, Francisco	
X-1-2	Name of signatory	CARPINTERO LOPEZ, Francisco	
X-1-3	Capacity	(Representative)	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	---	--

V. DISCUSIÓN

A pesar de los avances en la supervivencia del injerto después del primer año del trasplante renal, la expectativa de vida del órgano trasplantado a largo plazo no ha cambiado de forma significativa en las últimas décadas. La supervivencia media para riñones provenientes de un donante cadáver es de aproximadamente 11 años y la fisiopatología de la pérdida tardía del injerto es multifactorial.⁹⁷ El análisis histológico del injerto renal, indica que la disfunción crónica del injerto tiene diferentes subtipos según el grado de inflamación, la presencia de fibrosis intersticial y atrofia tubular, hiperplasia vascular intimal y glomerulopatía crónica del trasplante.⁹⁸

La búsqueda de una correlación entre daño histopatológico y pronóstico, ha obligado desde la década de los 90 a establecer unos parámetros histopatológicos objetivos y reproducibles que persiguen la cuantificación de diferentes parámetros histopatológicos de cronicidad²⁵. Sin embargo aunque las causas de la DCI son variadas y complejas, los hallazgos histológicos tienden a repetirse y se solapan en diferentes etiologías. Usualmente la toxicidad crónica por inhibidores de calcineurina se manifiesta como fibrosis intersticial y atrofia tubular sin presencia de inflamación, el rechazo celular se asocia a tubulitis con o sin diversos grados de fibrosis, y la presencia de C4d positivo acompañada de glomerulopatía del trasplante generalmente se relaciona con una lesión mediada por inmunidad humoral que cuando se detecta acompañada de la presencia de anticuerpos donante específicos confirma el diagnóstico de rechazo crónico activo mediado por anticuerpos.

Como aproximadamente el 50% de los enfermos desarrolla disfunción crónica del injerto a los 2 años del trasplante renal y hasta la fecha no disponemos de

un tratamiento que revierta la fibrosis del injerto, es una necesidad de primer orden poder disponer de un abordaje no invasivo que permita distinguir de forma temprana al grupo de pacientes afectados, proclives a perder el injerto; para instaurar medidas terapéuticas antes que la disfunción del injerto sea evidente para el clínico.

Actualmente el análisis mediante biopsia protocolizada del injerto con buena función es el método de elección para calcular y predecir el riesgo de pérdida del injerto y también es la herramienta que aporta indicios sobre el posible mecanismo patogénico de la DCI y por lo tanto guía la terapia inmunosupresora a seguir.⁹⁹ Sin embargo diversos mecanismos etiológicos como la toxicidad crónica por anti-calcineurínicos, el rechazo celular y humoral, y las infecciones generan una lesión tisular inicial, temporal, que tiene como morfología final y común: la presencia de fibrosis intersticial y atrofia tubular.¹⁰⁰⁻¹⁰¹ Por este motivo se ha generado una iniciativa mundial para investigar nuevos abordajes diagnósticos no invasivos que permitan detectar y seguir la evolución de la DCI y sus diferentes subtipos histológicos, para optimizar la información que aporta la histología actualmente y para contar con una herramienta no invasiva que en el futuro sustituya a la punción-biopsia del injerto renal.

Algunas de las estrategias estudiadas son la caracterización de anticuerpos en suero,¹⁰² la determinación de marcadores individuales (solubles o celulares) (proteínas o genes) en sangre periférica y orina¹⁰³ y la evaluación de la alo inmunidad celular periférica.¹⁰⁴ Incluso se utilizaron abordajes genómicos y proteómicos para intentar establecer nuevos marcadores de tolerancia inmunológica en el trasplante renal¹⁰⁵, sin embargo esta tesis es la primera

prueba de concepto del valor del proteoma urinario en la distinción de pacientes con DCI y de dos de sus categorías histológicas: IFTA sin evidencia de otras lesiones y el rechazo crónico activo mediado por anticuerpos.

En la primera fase de la investigación también se describió el perfil proteómico que permite distinguir a pacientes con DCI de los pacientes trasplantados estable, sin lesión evidente y los iones peptídicos diferenciales han sido validados en una segunda serie de pacientes.

Un biomarcador es un indicador medible de un estado biológico específico y aunque históricamente se atribuyó a un rasgo físico o fisiológico cuantificable, en la medicina actual el término traduce rápidamente a marcador molecular y en esta tesis a un dominio proteico. Siguiendo esta línea, una vez confirmada nuestra presunción de que el perfil proteómico urinario permitía detectar la presencia de DCI y distinguir el rechazo crónico humoral de la IF/TA sin otra etiología identificable, la siguiente fase de esta tesis estaba dirigida al descubrimiento y cuantificación de los péptidos-biomarcadores de DCI. Actualmente SELDI-TOF y MALDI-TOF, son las técnicas de espectrometría de masas más difundidas en proteómica clínica y ambas han sido utilizadas con éxito en la búsqueda de marcadores, sin embargo tienen un limitado rango de precisión en la identificación de péptidos por que no pueden ser acoplados en línea con instrumentos de MS/MS, que son la herramienta idónea para la secuenciación de péptidos.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Esta realidad contrasta con la reproducibilidad y dinámico rango de precisión de técnicas como LC-MS, utilizada tradicionalmente en diagnóstico y aplicaciones forenses,¹⁰⁹ aunque es una herramienta bien documentada en proteómica urinaria.¹¹⁰⁻¹¹²

En esta tesis utilizamos un enfoque de LC-MS libre de marcaje para el descubrimiento de biomarcadores urinarios de DCI. Estudios previos demostraron que la orina contiene un gran número de péptidos pequeños, fuente potencial de marcadores por explorar.¹¹² Por este motivo y también para evitar la variabilidad que genera añadir tripsina en un análisis biológico, no se digirieron las muestras antes de realizar el análisis de más de 6000 iones identificados con LC-MS. Este abordaje no sólo evitó artefactos si no redujo el tiempo del análisis a 45 minutos por muestra y los resultados fueron validados mediante una técnica ortogonal, (Segundo trabajo, figuras 7-8-9) confirmando que esta novedosa estrategia es adecuada para cuantificar biomarcadores peptídicos. (CVs 10 – 15% en promedio).

Utilizando este abordaje, se identificaron péptidos específicos derivados de uromodulina y bradiquinina como biomarcadores de buen funcionamiento del injerto, ya que su presencia en la orina puede ser utilizada para identificar a los pacientes trasplantados con buena función del injerto e histología normal y distinguirlos de los pacientes trasplantados con DCI, que presenta disminución de los niveles de estos péptidos urinarios. Sin embargo, el mayor rendimiento diagnóstico de buen funcionamiento del trasplante se obtuvo al combinar el ión de m/z 638.0 derivado de uromodulina y el ión de m/z 642.5 no identificado en Swissprot version 5.1.6 restringida para entradas de humanos (15,720 secuencias) y utilizando MASCOT motor de búsqueda. De esta forma, niveles elevados del ión 642.5 y niveles bajos del ión 638.0 derivado de uromodulina son característicos de la orina proveniente de pacientes con DCI y permiten detectar subtipos de DCI. Los iones de m/z 645.59 y m/z 642.61 estaban aumentados de forma significativa en pacientes con rechazo crónico mediado

por anticuerpos respecto a pacientes con fibrosis intersticial y atrofia tubular aislada (4.4-2.7 fold change) y pacientes trasplantados con función estable del injerto (5.3-14.6 fold change) permitiendo cuantificar las diferencias entre estos dos subtipos de DCI ya demostradas en los análisis cualitativo con MALDI-TOF. Esta última habilidad de los biomarcadores encontrados es un hallazgo sobresaliente de esta tesis porque el rechazo crónico activo mediado por anticuerpos tiene un pobre pronóstico en cuanto supervivencia del injerto si se compara con el de un injerto que presenta fibrosis intersticial y atrofia tubular pura.⁹⁹

Es imprescindible contar con biomarcadores sensibles y específicos que puedan identificar los pacientes en riesgo de desarrollar DCI o con lesiones muy tempranas no identificables con los marcadores no invasivos actualmente utilizados en la práctica clínica. La creatinina sérica y el FG estimado con formulas no tienen un valor predictivo (IC incluye 0.5) cuando se compara retrospectivamente con la evaluación histológica mediante los índices de Banff.

80

La Uromodulina es una molécula de expresión exclusiva en el riñón y constituye la proteína más abundante en la orina del humano sano. Su papel fisiológico exacto no está dilucidado¹¹³ pero se ha involucrado en diversas nefropatías y en la inmunidad local del riñón.¹¹⁴ Hace más de dos décadas se realizó un estudio en biopsias de injertos renales con rechazo agudo celular y se identificó a la uromodulina en situación extra-tubular en el 63.6% de los especímenes evaluados y se postuló como posible candidato para monitorizar la función del trasplante renal.¹¹⁵ Posteriormente y en un trabajo preliminar, a

finales de los años 90, se realizó determinación uromodulina urinaria mediante ELISA, en el donante y receptor de trasplante renal de donante vivo para estudiar la influencia de la reducción aguda de masa renal en la excreción de esta proteína. La nefrectomía unilateral en un individuo sano se asoció con un incremento del 40% en la excreción de uromodulina mientras que el riñón que fue trasplantado no generó cambios en la excreción de uromodulina del receptor comparada con la determinación pre-nefrectomía en el donante. Además existía alguna correlación entre la tasa de excreción urinaria de uromodulina y el FG, cuyo origen no fue aclarado ya que la uromodulina no se filtra a nivel glomerular. ¹¹⁶⁻¹¹⁷ Los resultados de esta tesis indican que el marcador funcional ideal no es la molécula integra de uromodulina si no péptidos específicos derivados de uromodulina. La uromodulina, es un proteína que tiende a precipitar por lo que es susceptible de generar artefactos en el laboratorio en cambio los péptidos pequeños derivados de la molécula completa son solubles, fáciles de manipular e interpretar con diferentes técnicas biofísicas e inmunológicas. ¹¹⁸

Es necesario valorar el papel de estos péptidos derivados de uromodulina en la monitorización funcional de la historia natural de la enfermedad en otras nefropatías primarias prevalentes (diabética, isquémica, nefroangioesclerosis) para dilucidar si los hallazgos reportados en esta tesis, son exclusivos del injerto renal, o pueden ser utilizados como marcador sustituto de función renal en la orina de pacientes con cualquier tipo de nefropatía.

Además de la lesión inmunológica involucrada en el daño del injerto renal, el RAS juega un papel importante en el mecanismo de desarrollo de DCI de origen no inmune. ⁵⁰ Los fármacos que bloquean RAS son moléculas efectivas

en el control de la presión arterial, la proteinuria y otros factores de riesgo cardiovascular en el paciente trasplantado renal y en parte ejercen este efecto al potenciar a las quininas endógenas.¹¹⁹⁻¹²¹ Los múltiples ensayos clínicos aparecidos en los últimos años nos han permitido determinar las situaciones clínicas en las que los fármacos que bloquean el RAS tienen efecto renoprotector, así como determinar que un bloqueo más completo conlleva un mayor enlentecimiento de la progresión renal. No está claro sin embargo, qué pauta terapéutica consigue este objetivo. Se han planteado varios acercamientos a este propósito: monoterapia a dosis elevadas, distintas combinaciones, etc. sin que hasta ahora tengamos evidencia suficiente para recomendar ninguna de ellas frente al resto. Es muy posible que la proteinuria sea un marcador intermedio, de valor pronóstico, de forma que la dosis óptima sea aquella que consiga una reducción máxima de la misma, aunque también desconocemos si dosis superiores aportan algún efecto beneficioso adicional o solo efectos secundarios. Probablemente por la naturaleza de los estudios realizados y por la ausencia de un biomarcador que permita seguir objetivamente y titular la intensidad del bloqueo de RAS en nefroprotección.¹²² Desde este punto de vista los péptidos derivados de quininas, en particular bradiquinina descritos en esta tesis podrían ser evaluados en el futuro para monitorizar el bloqueo terapéutico de RAS en los pacientes con DCI y en otras nefropatías primarias proteinúricas.

En vista de la compleja relación entre factores biológicos y clínicos en la DCI y entre cambios histológicos tempranos y pronóstico del injerto es prioritaria la identificación de biomarcadores no invasivos de DCI para mejorar la supervivencia del injerto renal a largo plazo. El trabajo desarrollado en esta

tesis genera un grupo de bio-marcadores que en combinación pueden ser la base para desarrollar un panel de marcadores urinarios para el diagnóstico no invasivo de la DCI y sus subtipos histológicos que mejore el rendimiento de la biopsia protocolizada del injerto y que incluso pueda llegar a sustituir a una prueba invasiva por un examen rápido y sin riesgo añadido para el paciente. Validar la prueba de concepto descrita en esta tesis en una población amplia y variable facilitaría la introducción de una terapia inmunosupresora más específica e individualizada en el paciente y mejoraría la supervivencia del trasplante renal a largo plazo.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos durante la realización de la presente tesis podemos extraer las siguientes conclusiones:

Conclusiones específicas

1-Hasta donde conocemos esta tesis representa la primera prueba de concepto de la utilidad de un abordaje proteómico urinario, global en el diseño de una herramienta diagnóstica no invasiva para el diagnóstico de la disfunción crónica del injerto renal.

2- Además de ser una aplicación novedosa en el campo clínico del trasplante renal, también representa un trabajo original desde el punto de vista tecnológico ya que se diseñó una estrategia rápida y de buen rendimiento para el procesamiento de muestras a gran escala basada en los siguientes pilares:

-Perfil directo de espectrometría de masas sin utilizar la técnica convencional de electroforesis de dos dimensiones.

-Análisis de las muestras sin incluir manipulación con tripsina para evitar artefactos.

-Procesamiento de los datos mediante algoritmos informáticos nuevos en el campo de la proteómica urinaria.

3- Péptidos específicos derivados de uromodulina y bradiquinina son candidatos a biomarcadores de buen funcionamiento del injerto renal, ya que su presencia en la orina puede ser utilizada para discriminar entre pacientes trasplantados con DCI y pacientes trasplantados con buena función del injerto.

4- Los niveles elevados del ión 642.5 y niveles bajos del ión 638.0 derivado de uromodulina son característicos de la orina proveniente de pacientes con DCI y permiten detectar subtipos de DCI.

5- Los iones de m/z 645.59 y m/z 642.61 estaban aumentados de forma significativa en pacientes con rechazo crónico activo mediado por anticuerpos respecto a pacientes con fibrosis intersticial y atrofia tubular aislada (4.4-2.7 fold change) y pacientes trasplantados con función estable del injerto (5.3-14.6 fold change) permitiendo cuantificar las diferencias entre estos dos subtipos de DCI ya demostradas en los análisis cualitativo con MALDI-TOF.

6- Los resultados de esta tesis indican que el marcador funcional ideal no es la molécula integra de uromodulina si no péptidos específicos derivados de esta molécula. La uromodulina es un proteína que tiende a precipitar por lo que es susceptible de generar artefactos en el laboratorio en cambio los péptidos pequeños derivados de la molécula completa son solubles, fáciles de manipular e interpretar con diferentes técnicas biofísicas e inmunológicas.

7- Los péptidos derivados de bradiquinina descritos en esta tesis podrían ser evaluados en el futuro para monitorizar el bloqueo terapéutico del sistema renina-angiotensina-aldosterona en los pacientes con DCI y en otras nefropatías primarias.

8- Estos resultados avalan que un panel de biomarcadores mejora el rendimiento diagnóstico respecto a un marcador individual en la DCI.

Conclusión general

Esta tesis es la primera prueba de concepto del valor del proteoma urinario en la distinción de pacientes con DCI y de dos de sus categorías histológicas: IFTA sin evidencia de otras lesiones y el rechazo crónico activo mediado por anticuerpos.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, et al. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000 Mar 2;342(9):605-12.
2. Paul LC. Chronic allograft nephropathy: An update. *Kidney International* 1999, 56: 783.
3. Paul LC. Chronic renal transplant loss. *Kidney Int.* 1995 Jun;47(6):1491-9.
4. Ojo AO, Hanson JA, Wolfe RA, Leichtman AB, Agodoa LY, Port FK. Long-term survival in renal transplant recipients with graft function. *Kidney Int.* 2000 Jan;57(1):307-13.
5. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RDM, Jeremy R. Chapman JR: The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2326.
6. Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, Serur D, Mouradian J, Schwartz JE, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med.* 2001 Mar 29;344(13):947-54.
7. Jones R: The impact of molecular medicine on health services. *Nature Medicine* 1990; 2:959-960.
8. Guttmacher AE, Collins FS: Genomic medicine, a primer. *N Engl J Med* 2002; 347:1512-1520.
9. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000; 405:837-46.
10. Williams KL. Genomes and Proteomes: towards a multidimensional view of biology. *Electrophoresis* 1999; 20:678-88.
11. Naaby-Hansen S, Waterfield D, Cramer R. Proteomics: post-genomic cartography to understand gene function. *Trends Pharm Sci* 2001; 22: 376-85.
12. Abbott A. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature* 1999; 402 :715-20.
13. Lee RT. Functional genomics and cardiovascular drug discovery. *Circulation* 2001; 104:1441-6.
14. Gygi SP. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1720-30.
15. Williams K, Hochstrasser F. Introduction to the Proteome. En: Wilkins MR, Williams K, Appel R, Hochstrasser D, editor. *Proteome Research: New frontiers in Functional Genomics*. Nueva York: Springer, 1997; p. 1-12.

16. Blackstock W, Weir M. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Tibtech* 1999; 17:121-7.
17. Liebler DC. Introduction to Proteomics. Tools for the new biology. Totowa: Humana Press NJ, 2002; p. 15-24.
18. Collins F, Lander E. DNA microarrays. *Nature Genetics* 1999; 21(Suppl 1):1-56.
19. Gygi S, Rist B, Aebersold R. Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. *Curr Opin Biotechnol* 2000;11: 396-401.
20. O'donovan C, Apweiler M, Bairoch A. The human proteomics initiative (HPI). *Trends Biotechnol* 2001; 19:178-81.
21. Lee KH. Proteomics: a technology-driven and technology-limited discovery science. *Trends Biotechnol* 2001;19:217-22.
22. Anderson N, Matheson A, Steiner S. Proteomics: applications in basic and applied biology. *Curr Opin Biotechnol* 2000;11:408-12.
23. Ideker T, Thorsson V, Ranish JA, Christmas R, Buhler J, Eng JK, Bumgarner R, Goodlett DR, Aebersold R, Hood L. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science*. 2001; 292:929-34.
24. Cox J, Mann M. Is proteomics the new genomics? *Cell* 2007;130, 395-8
25. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, Campbell PM, K. Cascalho M, Collins AB, Demetris AJ, Drachenberg CB, Gibson IW, Grimm PC, Haas M, Lerut E, Liapis H, Mannon RB, Marcus PB, Mengel M, Mihatsch MJ, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Platt LJ, Randhawa P, Roberts I, Salinas-Madruga L, Salomon DR, Seron D, Sheaff M, Weening JJ: Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7: 518-26.
26. US Renal data system. US Renal Data System: Excerpts from the USRDS 2003 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: s1–s230.
27. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK: Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999; 341: 1725.
28. Solez K, Vincenti F, Filo RS. Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from a U.S. multicentre kidney transplant trial comparing tacrolimus versus cyclosporine: a report of the FK506 Kidney Transplant study Group.

Transplantation. 1998; 66:1736-40.

29. Seron D, Moreso F, Bover J, Condom E, Gil-Vernet S, Canas C, Fulladosa X, Torras J, Carrera M, Grinyo JM, Alsina J. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int.* 1997 ;51:310-6.

30. Isoniemi HM, Krogerus L, von Willebrand E, Taskinen E, Ahonen J, Hayry P. Histopathological findings in well-functioning, long-term renal allografts. *Kidney Int.* 1992 ;41:155-60.

31. Dimeny E, Wahlberg J, Larsson E, Fellstrom B. Can histopathological findings in early renal allograft biopsies identify patients at risk for chronic vascular rejection? *Clin Transplant.* 1995 ;9:79-84.

32. Seron D, Moreso F, Ramon JM, Hueso M, Condom E, Fulladosa X, Bover J, Gil-Vernet S, Castela AM, Alsina J, Grinyo JM. Protocol renal allograft biopsies and the design of clinical trials aimed to prevent or treat chronic allograft nephropathy. *Transplantation.* 2000 May 15;69(9):1849-55.

33. Rush DN, Jeffery JR, Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. Clinico-pathological correlations using the Banff schema. *Transplantation.* 1995 ;59:511-4.

34. Gloor J, Cosio F, Lager DJ, Stegall MD. The spectrum of antibody-mediated renal allograft injury: implications for treatment. *Am J Transplant.* 2008;8:1367-73.

35. Nankivell BJ, Chapman JR. The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies. *Am J Transplant.* 2006;6:2006-12.

36. Serón D, Moreso F. Protocol biopsies in renal transplantation: prognostic value of structural monitoring. *Kidney Int.* 2007 Sep;72(6):690-7.

37. Rush D. Protocol transplant biopsies: an underutilized tool in kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006;1:138-43.

38. Yilmaz S, Sar A. Pathogenesis and management of chronic allograft nephropathy. *Drugs.* 2008;68 Suppl 1:21-31.

39. Campistol JM, Grinyó JM. Exploring treatment options in renal transplantation: the problems of chronic allograft dysfunction and drug-related nephrotoxicity. *Transplantation.* 2001 Jun 15;71:SS42-51. 11583488.

40. Pascual J, Marcén R, Ortuño J. Renal function: defining long-term success. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19 Suppl 6:vi3-vi7.

41. Shihab F, Andoh T. Role of TGF β 1 in experimental chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 1996;49:1141-1151

42. Najafian B, Kasiske BL. Chronic allograft nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008;17(2):149-55.
43. Land W, Vincenti F. Toxicity-sparing protocols using mycophenolate mofetil in renal transplantation. *Transplantation*. 2005 ;80:S221-34.
44. Grinyó JM, Cruzado JM. Mycophenolate mofetil and sirolimus combination in renal transplantation. *Am J Transplant*. 2006;6:1991-9.
45. Isoniemi H, Taskinen E, Hayry P. Histological chronic allograft damage index accurately predicts chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1994; 58:1195-1198.
46. Eddy A. Molecular insights into renal interstitial fibrosis *J Am Soc Nephrol* 1996 ; 7:2495.
47. Border WA, Noble NA. TGF- β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-1295.
48. Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies. *Curr Opin Crit Care*. 2001;7:384-9.
49. Campistol JM, Iñigo P, Larios S, Bescos M, Oppenheimer F. Role of transforming growth factor- β 1 in the progression of chronic allograft nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16 Suppl 1:114-6.
50. Campistol JM, Iñigo P, Esforzado D, Del Castillo. Renoprotective effect (antihypertensive and antiproteinuric) of Losartan in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:754-761.
51. Liu G, Changsirikulchai S, Hudkins KL, Banas MC, Kowalewska J, Yang X, Wietecha TA, Volpone J, Gilbertson DG, Alpers CE. Identification of platelet-derived growth factor D in human chronic allograft nephropathy. *Hum Pathol*. 2008;39:393-402.
52. Hammerman MR. The growth hormone-insulin-like growth factor axis in kidney re-revisited. *Nephrol Dial Transplant*. 1999 Aug;14(8):1853-60.
53. Kahan BD. Potential therapeutic interventions to avoid or treat chronic allograft dysfunction. *Transplantation*. 2001;71:SS52-7.
54. Johnson DW. Growth factors and progressive renal disease. *Nephrology* 2000; 5: 251-261.
55. Hotchkiss H, Chu TT, Hancock WW, Schröppel B, Kretzler M, Schmid H, Liu Y, Dikman S, Akalin E. Differential expression of profibrotic and growth factors in chronic allograft nephropathy. *Transplantation*. 2006;81:342-9.

56. Yilmaz S, Isik I, Afrouzian M, Monroy M, Sar A, Benediktsson H, McLaughlin K. (2007) Evaluating the accuracy of functional biomarkers for detecting histological changes in chronic allograft nephropathy. *Transpl Int.*20, 608-15.
57. Fliser D, Novak J, Thongboonkerd V, Argilés A, Jankowski V, Girolami MA, Jankowski J, Mischak H. Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:1057-71.
58. Le Bricon T, Erlich D, Bengoufa D, Dussaucy M, Garnier JP, Bousquet B. Sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis of urinary proteins: application to multiple myeloma. *Clin Chem.* 1998 ;44:1191-7.
59. Tichy M, Stulik J, Kovarova H, Mateja F, Urban P. Analysis of monoclonal immunoglobulin light chains in urine using two-dimensional electrophoresis. *Neoplasma.* 1995;42(1):31-4.
60. Grover PK, Resnick MI. High resolution two-dimensional electrophoretic analysis of urinary proteins of patients with prostatic cancer. *Electrophoresis.* 1997;18:814-8.
61. Cutillas PR, Norden AG, Cramer R, Burlingame AL, Unwin RJ. Urinary proteomics of renal Fanconi syndrome. *Contrib Nephrol.* 2004;141:155-69.
62. Clarke, W., Silverman, B. C., Zhang, Z., Chan, D. W., Klein, A. S., and Molmenti, E. P. Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis. *Ann Surg* 2003; 237: 660-664.
63. Schaub, S., Rush, D., Wilkins, J., Gibson, I. W., Weiler, T., Sangster, K., Nicolle, L., Karpinski, M., Jeffery, J., and Nickerson, P. Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:219-227.
64. O'Riordan, E., Orlova, T. N., Mei, J. J., Butt, K., Chander, P. M., Rahman, S., Mya, M., Hu, R., Momin, J., Eng, E. W., Hampel, D. J., Hartman, B., Kretzler, M., Delaney, V., and Goligorsky, M. S. Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15, 3240-3248.
65. Schaub S, Wilkins JA, Antonovici M, et al. Proteomic-based identification of cleaved urinary beta2- microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allografts. *Am J Transplant* 2005;5:729–738.
66. O'Riordan, E., Orlova, T. N., Podust, V. N., Chander, P. N., Yanagi, S., Nakazato, M., Hu, R., Butt, K., Delaney, V., and Goligorsky, M. S. Characterization of urinary peptide biomarkers of acute rejection in renal allografts. *Am J Transplant* 2007; 7: 930-940.

67. Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000;21:1037-53.
68. Washburn M, Yates J. New methods of proteome analysis: multidimensional chromatography and mass spectrometry. *Proteomics: A Trend Guide* 2000; 27-30.
69. Mann M, Hendrickson R, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 437-73.
70. Görg A. Advances in 2D gel techniques. *Proteomics: A Trend Guide* 2000; 3-6.
71. Klose J. Large-gel 2-D electrophoresis. *Meth Mol Biol* 1999; 112:147-72.
72. Timms JF, Cramer R. Difference gel electrophoresis. *Proteomics* 2008; 8: 4886-97.
73. Pisitkun T, Hoffert JD, Yu MJ, Knepper MA. Tandem mass spectrometry in physiology. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22: 390-400
74. America AH, Cordewener JH. Comparative LC-MS: a landscape of peaks and valleys. *Proteomics*. 2008;8:731-49.
75. Kicman AT, Parkin MC, Iles RK. An introduction to mass spectrometry based proteomics-detection and characterization of gonadotropins and related molecules. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;260-262:212-27.
76. Wu CC, MacCoss MJ. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr Opin Mol Ther*. 2002 ;4(3):242-50.
77. Vilkas, E. and Lederer, E. N-methylaion of peptides by the method of Hakomori. Structure of mycoside Cbl. *Tetrahedron Lett*. 1968 , 3089.
78. Fenn, J. B., Mann, M., et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989 ; 246: 64.
79. Karas, M. and Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem*. 1988; 60: 2299.
80. Tanaka, K., Waki, H., et al. Protein and polymer analysis up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 1988; 2: 151.
81. Ho YP, Reddy PM. Mass spectrometry-based approaches for the detection of proteins of *Staphylococcus* species. *Infect Disord Drug Targets*. 2008; 8:166-82.
82. Whitehouse, C. R., Dreyer, R. N., et al. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal. Chem*. 1985; 57: 675.

83. Yamashita, M. and Fenn, J. B. *Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme*. *J. Phys. Chem.* 1984; 88:4451.
84. Farmer, T. B. and Caprioli, R. M. Determination of protein-protein interactions by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 1998; 33: 697.
85. Qian WJ, Jacobs JM, Liu T, Camp DG, Smith RD. Advances and Challenges in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-based Proteomics Profiling for Clinical Applications. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 1727-1744.
86. Liu S, Zhang C, Xu YF, Yang F, Sun MZ. Electrospray ionization mass spectrometry as a critical tool for revealing new properties of snake venom phospholipase A(2). *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2009 ;23:1158-66
87. Priego Capote F, Sanchez JC. Strategies for proteomic analysis of non-enzymatically glycosylated proteins. *Mass Spectrom Rev.* 2009;28:135-46.
88. Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol* 2006;24: 971-83
89. Nakazawa T, Yamaguchi M, Okamura TA, Ando E, Nishimura O, Tsunasawa S. Terminal proteomics: N- and C-terminal analyses for high-fidelity identification of proteins using MS. *Proteomics.* 2008;8:673-85.
90. Ahmed FE. Utility of mass spectrometry for proteome analysis: part I. Conceptual and experimental approaches. *Expert Rev Proteomics.* 2008;5:841-64.
91. Zerefos P, Prados J, Kossida S, Kalousis A, Vlahou A: Sample preparation and bioinformatics in MALDI profiling of urinary proteins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;853 (1-2):20-30.
92. Saeed AI, Sharon V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J: TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 2003; 34(2): 374-8.
93. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98 :5116-21.
94. Zweig MH, Campbell G: Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993 ;39: 561.
95. Cutillas PR, Vanhaesebroeck B. Quantitative profile of five murine core proteomes using label-free functional proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2007; 6, 1560-73.

96. Eisen, MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns PNAS1998; 1: 14863 – 14868.
97. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S, Collins AB, Pascual M, Tolkoff-Rubin NE, Williams WW, Cosimi AA, Schneeberger EE, Colvin RB: Chronic humoral rejection: Identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 2001;12: 574–582.
98. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickeleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M: Banff 07 classification of renal allograft pathology: Updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; 8: 753–760.
99. Cosio FG, Grande JP, Wadei H, Larson TS, Griffin MD, Stegall MD: Predicting subsequent decline in kidney allograft function from early surveillance biopsies. *Am J Transplant* 2005; 5: 2464–2472.
100. Mengel M, Chapman JR, Cosio FG, Cavaille-Coll MW, Haller H, Halloran PF, Kirk AD, Mihatsch MJ, Nankivell BJ, Racusen LC, Roberts IS, Rush DN, Schwarz A, Seron D, Stegall MD, Colvin RB: Protocol biopsies in renal transplantation: Insights into patient management and pathogenesis. *Am J Transplant* 2007; 7: 512–517.
101. Moreso F, Ibernón M, Goma M, Carrera M, Fulladosa X, Hueso M, Gil-Vernet S, Cruzado JM, Torras J, Grinyo JM, Seron D: Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. *Am J Transplant* 2006; 6: 747–752.
102. Terasaki PI, Ozawa M, Castro R: Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant* 2007; 7: 408–415.
103. Hu H, Aizenstein BD, Puchalski A, Burmania JA, Hamawy MM, Knechtle SJ: Elevation of CXCR3-binding chemokines in urine indicates acute renal-allograft dysfunction. *Am J Transplant* 2004; 4: 432–437.
104. Augustine JJ, Siu DS, Clemente MJ, Schulak JA, Heeger PS, Hricik DE: Pre-transplant IFN-gamma ELISPOTs are associated with post-transplant renal function in African American renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005; 5: 1971–1975.
105. Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, Hsieh SC, Baeten D, Zhang M, Ashton-Chess J, Braudeau C, Hsieh F, Dupont A, Pallier A, Moreau A, Louis S, Ruiz C, Salvatierra O, Souillou JP, Sarwal M: Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104: 15448–15453.

106. Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ, Massion PP, Larsen PH, White BC, Roberts JR, Edgerton M, Gonzalez A, Nadaf S, Moore JH, Caprioli RM, Carbone DP: Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1991; 362: 433-9.
107. Yanagisawa K, Tomida S, Shimada Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T:
A 25-signal proteomic signature and outcome for patients with resected non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007;99: 858-67.
108. Schwartz SA, Weil RJ, Johnson MD, Toms SA, Caprioli RM. Protein profiling in brain tumors using mass spectrometry: feasibility of a new technique for the analysis of protein expression. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 981-7.
109. Maurer HH. Hyphenated mass spectrometric techniques-indispensable tools in clinical and forensic toxicology and in doping control. *J Mass Spectrom*.2006; 41:1399-413.
- 110 Spahr CS, Davis MT, McGinley MD, Robinson JH, Bures EJ, Beierle J, Mort J, Courchesne PL, Chen K, Wahl RC, Yu W, Luethy R, Patterson SD. Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. I. Profiling an unfractionated tryptic digest. *Proteomics*.2001; 1:93-107.
- 111 Cutillas PR, Norden AG, Cramer R, Burlingame AL, Unwin RJ. Detection and analysis of urinary peptides by on-line liquid chromatography and mass spectrometry: application to patients with renal Fanconi syndrome. *Clin Sci (Lond)*.2003;104:483-90.
112. Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen JV, Mann M. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol*. 2006; 7, R80
113. Hoyer JR, Seiler MW. Pathophysiology of Tamm-Horsfall protein. *Kidney Int*.1979;16: 279–89.
114. Kokot F, Dulawa J. Tamm-Horsfall protein updated. *Nephron*.2000; 85:97–102.
- 115 Howie AJ, Brewer DB. Extra-tubular deposits of Tamm-Horsfall protein in renal allografts. *J Pathol*.1983;139:193-206.
116. Torffvit O, Kamper AL, Strandgaard S. Tamm-Horsfall protein in urine after uninephrectomy/transplantation in kidney donors and their recipients. *Scand J Urol Nephrol*.1997; 31: 555-9.
117. Kaden J, Groth J, May G, Liedvogel B. Urinary Tamm-Horsfall protein as a marker of renal transplant function. *Urol Res*. 1994; 22:131-6.

118. Beshensky AM, Wesson JA, Worcester EM, Sorokina EJ, Snyder CJ, Kleinman JG.(2001) Effects of urinary macromolecules on hydroxyapatite crystal formation. *J Am Soc Nephrol.*2001;12: 2108-16.

119. Madeddu P, Emanuelli C, El-Dahr S. Mechanisms of disease: the tissue kallikrein-kinin system in hypertension and vascular remodeling. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2007; 3: 208-21.

120. Phipps JA, Feener EP. The kallikrein-kinin system in diabetic retinopathy: lessons for the kidney. *Kidney Int.* 2008; 73, 1114-9.

121. Bakris GL. Slowing nephropathy progression: focus on proteinuria reduction. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3 :S3-10.

122. Taal MW, Brenner BM. Renal risk scores: progress and prospects. *Kidney Int.* 2008; 73:1216-9.