



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

# Πρώιμοι Δείκτες Υπερτασικής Νεφροσκλήρυνσης

ΜΠΑΡΚΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ MSc

ΑΘΗΝΑ 2019

«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,  
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης





Στον πατέρα μου,

## Περιεχόμενα

<b>ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ</b> .....	<b>5</b>
<b>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ</b> .....	<b>7</b>
<b>ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ - ΤΙΜΗΤΙΚΕΣ ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ</b> .....	<b>8</b>
<b>ΣΥΝΕΔΡΙΑ</b> .....	<b>9</b>
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	<b>11</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>13</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>15</b>
1.1 ΝΕΦΡΟΙ: ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ .....	15
1.1.1 Δομή Νεφρού .....	15
1.1.2 Λειτουργία του νεφρώνα: Από τη σπειραματική διήθηση στην παραγωγή ούρων .....	18
1.2 ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ.....	23
1.3 ΥΠΕΡΤΑΣΗ .....	26
1.3.1 Επιδημιολογικά δεδομένα .....	26
1.3.2 Υπέρταση και Νεφρός.....	27
1.3.3 Υπερτασική νεφροσκλήρυνση .....	27
1.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ .....	30
1.4.1. Υπερτασικό μοντέλο SHR (Spontaneously Hypertensive Rat).....	31
1.5 ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ .....	33
1.6 CHLORIDE INTRACELLULAR CHANNEL PROTEIN 4, CLIC4 .....	36
1.7 SODIUM/GLUCOSE CO-TRANSPORTER 2, SGLT2 .....	37
1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....	39
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>40</b>
2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ .....	40
2.2 ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....	41
2.2.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών.....	41
2.2.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων .....	41
2.2.3 Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση 2DE.....	42
2.2.4 Ανάλυση εικόνας δισδιάστατων πηκτωμάτων (Image Analysis) .....	44
2.2.5 Φασματομετρία μάζας.....	45
2.2.6 LC-MS/MS.....	46
2.2.7 Ποσοτικοποίηση και στατιστική ανάλυση των LC-MS/MS αποτελεσμάτων.....	47
2.2.8 GeLC-MS/MS .....	48
2.3 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOTTING) .....	50
2.3.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (PAGE) .....	50
2.3.2 Ανοσοαποτύπωση (immunoblotting).....	52
2.4 ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ .....	55
2.5 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ .....	56
2.6 LASER CAPTURE MICRODISSECTION .....	57
2.7 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ RNA .....	58
2.7.1 Απομόνωση RNA .....	58
2.7.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA .....	58
2.7.3 Σύνθεση cDNA.....	59
2.7.4 RT-qPCR: Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου .....	59
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>61</b>
3.1 ΜΕΣΗ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΠΙΕΣΗ ΤΩΝ ΖΩΩΝ .....	61
3.2 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ.....	62
3.3 ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	63
3.3.1 Αποτελέσματα 2DE MALDI-MS .....	63
3.3.2 Αποτελέσματα LC-MS/MS ανάλυσης.....	69
3.3.3 Αποτελέσματα Laser Capture Microdissection .....	75
3.4 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ .....	78
3.4.1 Επιβεβαίωση των ευρημάτων της πρωτεομικής ανάλυσης για την πρωτεΐνη CLIC4 .....	78
3.4.2 Επιβεβαίωση των ευρημάτων της πρωτεομικής ανάλυσης για την πρωτεΐνη SGLT2.....	83

<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....</b>	<b>87</b>
4.1 ΓΕΝΙΚΑ .....	87
4.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ 2DE MALDI-MS .....	89
4.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ LC-MS/MS .....	91
4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ LASER CAPTURE MICRODISSECTION ΚΑΙ GeLC-MS/MS .....	93
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ .....</b>	<b>98</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>100</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>	<b>110</b>
<i>Πίνακας Παραρτήματος 1.....</i>	<i>110</i>
<i>Πίνακας Παραρτήματος 2.....</i>	<i>123</i>
<i>Πίνακας Παραρτήματος 3.....</i>	<i>127</i>
<i>Πίνακας Παραρτήματος 4.....</i>	<i>137</i>
<i>Πίνακας Παραρτήματος 5.....</i>	<i>146</i>
<i>Πίνακας Παραρτήματος 6.....</i>	<i>155</i>
<i>Πίνακας Παραρτήματος 7.....</i>	<i>163</i>
<i>Πίνακας Παραρτήματος 8.....</i>	<i>172</i>
<i>Πίνακας Παραρτήματος 9.....</i>	<i>178</i>
<i>Πίνακας Παραρτήματος 10.....</i>	<i>188</i>
<i>Πίνακας Παραρτήματος 11.....</i>	<i>194</i>
<i>Πίνακας Παραρτήματος 12.....</i>	<i>195</i>

## ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

---

"Επειδή η διάσημος των Ιατρών Σχολή, του Πρυτάνεως επινεύσαντος ες τους εαυτοίς διδάκτορας δοκιμάσαι με καταξίωσιν, αυτή τε και τη Πρυτανική δημοσία τηνδε δίδωμι πίστιν. Ηγήσθε με τους διδάξαντας με ταύτην την τέχνην, ίσα γενέτησιν εμοίσι, τη δε τέχνη μηδαμή επ' ευμαρή χρήσεσθαι τη εμαυτού εν τω βίω, αλλ' εις δόξαν θεού και ανθρώπων σωτηρίην και της πίστεως αυτής τιμήν τε και όνησιν παν με ό,τι ιητρού έργον εστί, πιστώσ και ακριβώς κατά δύναμιν και κρίσιν την εμήν επιτελέων, τοίσι δε νοσέουσιν, ήν τε πλούσιοι τυχώσιν όντες ήν τε πένητες, ομοίη σπουδή την εκ τέχνης επαγινέων επικουρίην μηδέ, παραβόλως αποπειρώμενος την τεο ζόην αποκυβεύσειν μηδ' τητρεύσειν επί χρηματισμώ ή φάτιος ιμέρω. Ες οικίας δε οκόσας αν εσίω, εσελεήσεσθαι επ' ωφελείη καμνόντων εκτός εών πάσης αδικίης. Α δ' αν εν θεραπήη ή ιδω ή ακούσω ή και άνευ θεραπήης κατά βίον ανθρώπων, ά μη μήποτε εκλαλέεσθαι έξω, σιγήσεσθαι άρρητα ηγευμένος τα τοιαύτα, της δε τέχνης επιμελήσεσθαι κατά δύναμιν σπουδήν πλείστην ποιευμένος ακριβώσαι ταύτης τα θέσμια. Τοίσι δε ομοτέχοισι φιλόφρονα και φιλόανθρωπον εμαυτόν αεί παρέξειν και σφέας αδελφοίσιν ίσον επικρινέοιν άρρεσι πάν σφι προθύμως συμβαλλόμενος εξ ότεο αν ωελίη γένοιτο τοίσι κάμνουσι. Ταύτην μοι την επαγγελίην επιτελέα ποιέοντι είη επαύρασθαι βίου και τέχνης και Θεόν κτήσασθαι αρηγόνα, παραβαίνοντι δε τανάντια τουτέων".

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1. Δημήτριος Βλαχάκος (Επιβλέπων), Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ, Υπεύθυνος Νεφρολογικής Μονάδας**  
*Β' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Πανεπιστημιακό Γ. Ν. Αττικόν*
- 2. Αριστείδης Χαρώνης, Διευθυντής Ερευνών**  
*Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΒΕΑΑ)*
- 3. Παναγιώτης Πολίτης, Αναπληρωτής Ερευνητής**  
*Κέντρο Βασικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΒΕΑΑ)*

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1. Δημήτριος Βλαχάκος (Επιβλέπων), Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, ΕΚΠΑ**
- 2. Δημήτριος Αλεξόπουλος, Καθηγητής Καρδιολογίας, ΕΚΠΑ**
- 3. Χαρίκλεια Γακιοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολ. Ανατομικής, ΕΚΠΑ**
- 4. Αθανάσιος Ράπτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας, ΕΚΠΑ**
- 5. Αριστείδης Χαρώνης, Διευθυντής Ερευνών, ΙΒΕΑΑ**
- 6. Παναγιώτης Πολίτης, Αναπληρωτής Ερευνητής, ΙΒΕΑΑ**
- 7. Γεώργιος Παναγιώτου, Διευθυντής Ερευνών, ΕΚΕΒΕ Φλέμινγκ**

- **Georgios Barkas**, Manousos Makridakis, Rafael Stroggylos, Jerome Zoidakis, Antonia Vlahou, Aristidis Charonis, Demetrios V. Vlahakos. *Comparative proteomic analysis in microdissected renal vessels from hypertensive SHR and WKY normotensive rats*. Journal of integrated OMICS doi: 10.5584/jiomics.v9i1.250.
- Hatziioanou D\*, **Barkas G\***, Critselis E, Zoidakis J, Gakiopoulou H, Androutsou ME, Drossopoulou G, Charonis A, Vlahakos DV. *Chloride Intracellular Channel 4 Overexpression in the Proximal Tubules of Kidneys from the Spontaneously Hypertensive Rat: Insight from Proteomic Analysis*. Nephron. 2018;138(1):60-70. doi: 10.1159/000479169. Epub 2017 Nov 7. \* **first co-authors**
- Margaritis LH, Manta AK, Kokkaliaris KD, Schiza D, Alimisis K, **Barkas G**, Georgiou E, Giannakopoulou O, Kollia I, Kontogianni G, Kourouzidou A, Myari A, Roumelioti F, Skouroliakou A, Sykioti V, Varda G, Xenos K, Ziomas K. *'Drosophila oogenesis as a bio-marker responding to EMF sources'*. Electromagn Biol Med. 2014 Sep;33(3):165-89. doi: 10.3109/15368378.2013.800102. Epub 2013 Aug 5.
- **Γ. Μπάρκας**, Μ. Μακρυδάκης, Ι. Ζωιδάκης, Α. Βλάχου, Α. Χαρώνης, Δ. Βλαχάκος *'Σύγκριση της πρωτεομικής ανάλυσης των ενδοεφρικών αρτηριδίων υπέρτασικών και νορμοτασικών ζώων'*, Αρτηριακή Υπέρταση, Τόμος 27 - Τεύχος 3: 187-188, 2018 (Βραβευμένη εργασία από την Ελληνική Εταιρεία Υπέρτασης)



### ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- Υποτροφία από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση 2014-2020» στο πλαίσιο της πράξης: «Υποστήριξη ερευνητών με έμφαση στους νέους ερευνητές - κύκλος Β'»
- Υποτροφία του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) με κωδικό ΟΠΣ 5000432 για την εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής. **1<sup>η</sup> θέση στον τομέα 'Επιστήμες Υγείας'** με συνολική βαθμολογία 93,58/100
- Υποτροφία του Ελληνικού Ιδρύματος Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ 1<sup>ος</sup> κύκλος) για την εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής. (Δεν αποδέχτηκα την υποτροφία λόγω της υποτροφίας του ΙΚΥ)

### ΒΡΑΒΕΙΑ

- **Έπαινο Προφορικής Ανακοίνωσης**, 21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Δελφοί 29 Μαΐου - 1 Ιουνίου 2019
- **Έπαινο Αναρτημένης Ανακοίνωσης**, 20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Αθήνα 3-6 Μαΐου 2018
- **Βραβείο Καλύτερης Εργασίας**, 18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Υπέρτασης, Αθήνα 29-31 Μαρτίου 2018
- **Alberto Ferrari Poster Prize**, 26<sup>th</sup> European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection, ESH, Paris, June 10-13, 2016.
- **Έπαινο Αναρτημένης Ανακοίνωσης**, 19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Καλαμάτα, 11-14 Μαΐου 2016

- **Γ. Μπάρκας**, Μ. Μακρυδάκης, Ι. Ζωιδάκης, Α. Βλάχου, Α. Χαρώνης, Δ. Βλαχάκος 'Πρώιμες αλλοιώσεις του νεφρικού παρεγχύματος στην υπέρταση', 21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Δελφοί 29 Μαΐου - 1 Ιουνίου 2019 (προφορική ανακοίνωση, έπαινο)
- **G. Barkas**, A. Hatzioannou, J. Zoidakis, M. Makridakis, A. Vlahou, A. Charonis, D.V.Vlahakos "Hypertensive Nephrosclerosis: In search of biomarkers for early damage", 31<sup>st</sup> European Renal Cell Study Group, March 2019, Korinthia, Greece
- **Georgios Barkas**, Manousos Makridakis, Jerome Zoidakis, Antonia Vlahou, Aristidis Charonis, Demetrios V. Vlahakos. '*Comparative proteomic analysis in microdissected renal vessels of hypertensive and normotensive rats.*' 28<sup>th</sup> European Meeting on Hypertension, Barcelona 2018 (αναρτημένη ανακοίνωση)
- **Γ. Μπάρκας**, Μ. Μακρυδάκης, Ι. Ζωιδάκης, Α. Βλάχου, Α. Χαρώνης, Δ. Βλαχάκος. '*Πρωτεομική ανάλυση του αγγειακού διαμερίσματος του νεφρικού παρεγχύματος με την τεχνική LCM (Laser Capture Microdissection)*' 20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Αθήνα, 03-06 Μαΐου 2018. (αναρτημένη ανακοίνωση, έπαινο)
- **Γ. Μπάρκας**, Μ. Μακρυδάκης, Ι. Ζωιδάκης, Α. Βλάχου, Α. Χαρώνης, Δ. Βλαχάκος. '*Σύγκριση Της Πρωτεομικής Ανάλυσης Των Ενδονεφρικών Αρτηριδίων Υπερτασικών Και Νορμοτασικών Ζώων*' 18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο συνέδριο Υπέρτασης, Αθήνα 29-31 Μαρτίου 2018. (αναρτημένη ανακοίνωση, βραβείο καλύτερης εργασίας)
- A. Hatzioannou, **G. Barkas**, E. Critselis, J. Zoidakis, A. Vlachou, A. Charonis, D. Vlahakos '*Proteomic analysis of kidneys from spontaneously hypertensive and normal rats reveals clic-4, as a putative biomarker in hypertensive nephropathy*'. 26<sup>th</sup> European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection, ESH, Paris, June 10-13, 2016. (Alberto Ferrari Poster Prize)

- A. Hatzioannou, **G. Barkas**, E.Critselis, J. Zoidakis, A. Vlachou, A. Charonis, D.V. Vlahakos ‘*Proteomic analysis of kidneys from spontaneously hypertensive and normal rats reveals CLIC-4, as a putative biomarker in hypertensive nephropathy*’ 53<sup>th</sup> Congress ERA-EDTA Vienna, Austria 2016 (αναρτημένη ανακοίνωση)
- A. Χατζηϊωάννου, **Γ. Μπάρκας**, E. Κριτσέλλη, I. Ζωϊδάκης, A. Βλάχου, A. Χαρώνης, Δ. Βλαχάκος ‘*Πρωτεομική ανάλυση νεφρικού ιστού αναδεικνύει πως τα κανάλια χλωρίου 4 (CLIC-4) στο εγγύς εσπειραμμένο σωληνάριο αποτελούν βιοδείκτη ανάπτυξης και υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης σε SHR υπερτασικούς αρουραίους*’, 19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο συνέδριο Νεφρολογίας, Καλαμάτα 2016 (προφορική ανακοίνωση, βραβείο καλύτερης εργασίας)
- A. Charonis, **G. Barkas**, P. Sideras, A. Stavropoulos, P. Moulos, E. Arvaniti, P. Politis ‘*Combining system biology and animal model approaches for the study of renal fibrosis*’, European Renal Cell Study Group 28<sup>th</sup> Annual Meeting, France 2016 (προφορική ανακοίνωση)
- **G. Barkas**, A. Stavropoulos, A. Sountoulidis, P. Sideras, A. Charonis, ‘*Differential activation of TGF- $\beta$  and BMP signaling pathways in renal fibrosis*’ 64<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, (αναρτημένη ανακοίνωση)

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

---

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής. Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Χαρόνη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και με υποδέχτηκε στο εργαστήριό του το 2012, για την επιστημονική καθοδήγηση στην παθοφυσιολογία του νεφρού κατά την διάρκεια του μεταπτυχιακού και της διδακτορικής διατριβής, για την πολύτιμη βοήθειά του για πάσης φύσεως επιστημονικά θέματα και για την στήριξή του σε επιστημονικό αλλά και σε προσωπικό επίπεδο σε δύσκολες στιγμές. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Παθολογίας-Νεφρολογίας του ΕΚΠΑ Δημήτριο Βλαχάκο για την πολύτιμη βοήθεια που παρείχε σε θέματα επιστημονικής και κλινικής φύσεως και ο οποίος ως επιβλέπων της διδακτορικής διατριβής συνέβαλε τα μέγιστα για την διεκπεραίωσή της και φρόντισε για την διάχυση των αποτελεσμάτων της έρευνάς μας σε επιστημονικά συνέδρια Υπέρτασης και Νεφρολογίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Πολίτη για την βοήθειά του καθ' όλη την διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο ως μεταπτυχιακός φοιτητής αρχικά και ως υποψήφιος διδάκτωρ αργότερα και ο οποίος ήταν πάντα πρόθυμος να βοηθήσει σε κάθε είδους επιστημονικής φύσεως ζητήματα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Βλάχου η οποία ήταν μέλος της τριμελούς επιτροπής σχεδόν καθ' όλη την διάρκεια της διατριβής και λόγω γραφειοκρατίας δεν μπορούσε να είναι μέχρι τέλους. Η καθοδήγησή της σε πάσης φύσεως θέματα Πρωτεομικής ανάλυσης ήταν πολύ σημαντική.

Η διδακτορική μου διατριβή θα ήταν αδύνατο να ολοκληρωθεί χωρίς την βοήθεια δύο εξαιρετων συνεργατών, του Δρ. Ζωιδάκη και του Δρ. Μακρυδάκη, από το εργαστήριο της Πρωτεομικής στο ΠΒΕΑΑ. Τους ευχαριστώ θερμά και τους δύο. Ο Δρ. Ζωιδάκης ανέλαβε να με εκπαιδεύσει στον κόσμο της πρωτεομικής αλλά και γενικότερα στο πεδίο της έρευνας. Η καθοδήγησή του στη συγγραφή επιστημονικών δημοσιεύσεων και ερευνητικών προτάσεων ήταν πολύτιμη και η συνεχής εμπύχωσή του σε συνδυασμό με την θετική του ενέργεια λειτούργησαν καταλυτικά για την αντιμετώπιση κάθε ζητήματος. Ο Δρ. Μακρυδάκης ανέλαβε να με εκπαιδεύσει κυρίως στο τεχνικό κομμάτι της πρωτεομικής. Η εκτενής εμπειρία του σε κάθε είδους μεθοδολογίας πρωτεομικής ανάλυσης καθώς και η προθυμία του να με βοηθήσει στον σχεδιασμό και την υλοποίηση των ερευνητικών πρωτοκόλλων απλοποίησε κατά πολύ τα πράγματα για μένα στο κομμάτι της πρωτεομικής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη (μεταπτυχιακούς και υποψήφιους διδάκτορες, πρώην και νυν) των εργαστηρίων του Δρ. Χαρώνη και του Δρ. Πολίτη για το εξαιρετικό κλίμα και τις ωραίες στιγμές που μοιραστήκαμε τα επτά χρόνια παραμονής μου αρχικά ως μεταπτυχιακός φοιτητής και αργότερα ως υποψήφιος διδάκτωρ. Ειδικότερα, θέλω να ευχαριστήσω τους: Άρτεμις Μιχαήλ, Δάφνη Αντωνίου, Δημήτρη Γκίκα, Νίκο Μαλισσόβα, Στέλιο Ραβανίδη, Μυρτώ Ρίζου, Τίνα Τσαμπούλα και Ελπινίκη Νίνου για την εξαιρετική συνεργασία σε επιστημονικό επίπεδο αλλά και για τις αξέχαστες στιγμές σε φιλικό επίπεδο. Επίσης, ευχαριστώ την τεχνικό του εργαστηρίου Βαλέρια Καλτεζιώτη για την βοήθειά της με όλα τα "safety" ζητήματα του εργαστηρίου αλλά και για την άψογη συνεργασία μας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την χρηματοδότηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα πιο σημαντικά πρόσωπα στη ζωή μου, την σύντροφό μου Αγγελική καθώς και την οικογένειά μου, για τη στήριξη και την αγάπη τους σε κάθε μου βήμα όλα αυτά τα χρόνια.

Γιώργος Μπάρκας, Βιολόγος MSc  
Αθήνα, 2019

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Η υπερτασική νεφροσκλήρυνση αποτελεί την δεύτερη αιτία, μετά τον διαβήτη, χρόνιας νεφρικής νόσου. Η πάθηση εξελίσσεται αθόρυβα σε ανεπάρκεια νεφρών και η διάγνωσή της είναι δύσκολη διότι δεν εμφανίζονται ειδικά συμπτώματα αλλά ούτε και μορφολογικές αλλοιώσεις στο νεφρικό παρέγχυμα στα αρχικά στάδια της ανάπτυξής της. Επιπλέον, δεν υπάρχουν αξιόπιστοι βιοδείκτες για την έγκαιρη εκτίμηση της νεφρικής βλάβης και οι ασθενείς εκδηλώνουν συμπτώματα όταν σχεδόν το 50% της λειτουργίας των νεφρών έχει χαθεί. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι να βρεθούν πρώιμοι δείκτες που θα επιτρέπουν την έγκαιρη διάγνωση της υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης και να αποσαφηνιστούν οι υποκείμενοι μηχανισμοί που οδηγούν στην εμφάνισή της και οι οποίοι σε μεγάλο βαθμό παραμένουν άγνωστοι.

Η καλύτερη προσέγγιση για την ανεύρεση τέτοιων πρωτεϊνών-δεικτών σε πολυπαραγοντικές παθολογικές καταστάσεις όπως η υπερτασική νεφροσκλήρυνση είναι η βιολογία συστημάτων και ειδικότερα η πρωτεομική ανάλυση. Καθώς η λήψη βιοψιών νεφρού είναι μια επίπονη εν πολλοίς μη ενδεικνυόμενη διαδικασία έχουν αναπτυχθεί διάφορα ζωικά μοντέλα μελέτης της υπέρτασης. Η μελέτη μας πραγματοποιήθηκε στο ευρέως διαδεδομένο υπερτασικό ζωικό μοντέλο Spontaneously Hypertensive Rat (SHR). Πραγματοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές αλλά συμπληρωματικές πρωτεομικές προσεγγίσεις στο νεφρικό παρέγχυμα υπερτασικών SHR και νορμοτασικών WKY (Wistar Kyoto rats) ζώων ηλικίας 6, 13 και 20 εβδομάδων με στόχο την ανάλυση του πρωτεόματος του νεφρού σε βάθος. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων αναγνωρίστηκε πλήθος πρωτεϊνών με διαφορετική έκφραση στα υπερτασικά ζώα και με πιθανό κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη της υπέρτασης. Η βιοπληροφορική ανάλυση κατέδειξε σημαντικά μονοπάτια που απορρυθμίζονται λόγω της υπέρτασης και τα οποία σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, την δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και την απόπτωση.

Από τις διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες δύο ήταν εκείνες που παρουσίασαν μεγάλο ενδιαφέρον, η CLIC4 και η SGLT2. Η έκφραση και των δύο αυτών πρωτεϊνών βρέθηκε σημαντικά αυξημένη στα υπερτασικά ζώα όλων των ηλικιών και επιλέχθηκαν ως πιθανοί πρώιμοι δείκτες υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης που χρήζουν περαιτέρω μελέτης. Τα ευρήματα της πρωτεομικής επιβεβαιώθηκαν με βιοχημικές και μορφολογικές τεχνικές. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η αυξημένη έκφραση τόσο της CLIC4 όσο και της SGLT2 εντοπίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων και ειδικότερα στην ψηκτροειδή παρυφή τους αυξάνοντας την πιθανότητα ότι τα μόρια αυτά μπορεί σε

παθολογικές καταστάσεις να εκκρίνονται στα ούρα μέσω εξωσωμάτων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την επιβεβαίωση στο μέλλον των ευρημάτων και σε υπερτασικούς ασθενείς είναι πολύ σημαντικό καθώς μπορεί να ανοίξει το δρόμο σε νέους τρόπους διάγνωσης της υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης σε πολύ πρώιμα στάδια και μάλιστα με μη επεμβατικό τρόπο.

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι πρώιμες αλλαγές συμβαίνουν στο σωληναριακό διαμέρισμα του νεφρού, και ότι οι αλλαγές αυτές είναι ειδικά εντοπισμένες στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια. Είναι γνωστό πως τα σωληνάκια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη νεφρική ανεπάρκεια και την οξεία νεφρική βλάβη ωστόσο, μέχρι τώρα δεν είχαν καταγραφεί τόσο πρώιμες μοριακές μεταβολές. Η μελέτη μας καταγραφεί για πρώτη φορά τέτοιες μεταβολές στα κύτταρα των εγγύς σωληναρίων στο μοντέλο SHR και μάλιστα πριν εκδηλωθούν οι τυπικές παθολογοανατομικές αλλαγές της υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης.

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

### 1.1 Νεφροί: Δομή και Λειτουργία

---

Οι νεφροί είναι δύο όργανα του ανθρώπινου σώματος που βρίσκονται εκατέρωθεν της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης κάτω από το διάφραγμα. Η βασική τους λειτουργία είναι να φιλτράρουν το αίμα και να το απαλλάσσουν από τις τοξίνες και τα μεταβολικά παραπροϊόντα που δεν χρειάζεται το σώμα, και να τα αποβάλλουν μέσω των ούρων. Επιπλέον, ρυθμίζουν το ισοζύγιο ύδατος και ανόργανων ιόντων ενώ εκκρίνουν και πολύ σημαντικές ορμόνες όπως η ερυθροποιητίνη, η ρενίνη και η 1,25-διϋδροξυβιταμίνη D<sub>3</sub>.

#### 1.1.1 Δομή Νεφρού

---

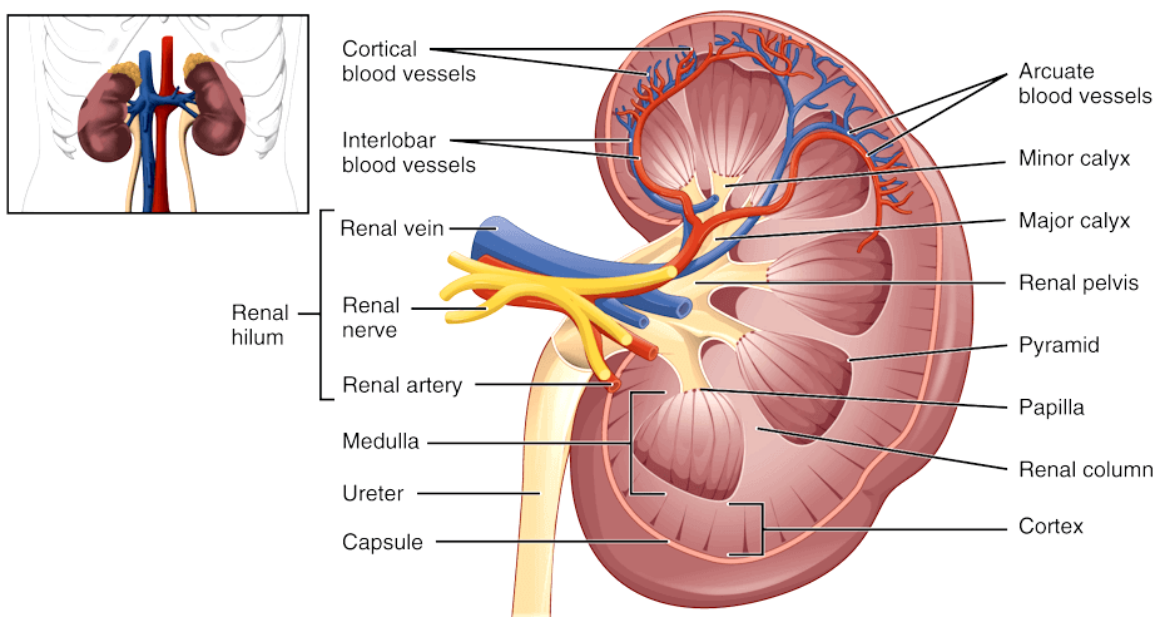
Σε κάθε νεφρό διακρίνονται δύο διακριτά στρώματα ιστού, ο φλοιός (*cortex*) εξωτερικά και ο μυελός (*medulla*) εσωτερικά. Ο μυελός αποτελείται από 8-12 πυραμιδοειδείς σχηματισμούς που ονομάζονται νεφρικές πυραμίδες (*renal pyramids*) και έχουν τη βάση τους στραμμένη προς το φλοιό και την κορυφή τους προς τη νεφρική κοιλία. Στην κορυφή κάθε πυραμίδας υπάρχει η θηλή (*papilla*). Οι κορυφές των νεφρικών πυραμίδων καταλήγουν στους νεφρικούς κάλυκες (*calyx*), όπου συλλέγονται τα ούρα. Οι κάλυκες εκβάλλουν στη νεφρική πύελο (*renal pelvis*) από όπου τα ούρα μεταφέρονται μέσω του ουρητήρα (*ureter*) στην ουροδόχο κύστη (Εικόνα 1).

Η νεφρική αρτηρία, που μπαίνει μέσα στο νεφρό από την πύλη, διακλαδίζεται σε μερικούς κλάδους που κατευθύνονται προς την περιφέρεια του οργάνου και δίνουν ευθείς κλάδους, τις μεσολόβιες αρτηρίες του νεφρού. Αυτές, περνώντας ανάμεσα από τους μίσχους των καλύκων, διακλαδίζονται σε μικρότερους κλάδους που έχουν σχήμα τόξου και γι' αυτό λέγονται τοξοειδείς αρτηρίες. Οι τοξοειδείς πηγαίνουν προς την περιφέρεια και δίνουν μικρούς κλάδους από τους οποίους προέρχονται λεπτότατα αρτηριακά στελέχη, τα προσαγωγά αρτηρίδια του νεφρικού σωματίου. Αυτά τροφοδοτούν το νεφρικό σωματίο με αρτηριακό αίμα που κυκλοφορεί μέσα σε ένα λεπτότατο τριχοειδικό δίκτυο με πολλές σπείρες που ονομάζεται αγγειώδες σπείραμα.

Επειδή το αίμα που φθάνει στο νεφρό από τη νεφρική αρτηρία αναγκάζεται να κυκλοφορήσει σε πολυδαίδαλα και πολύ λεπτά τριχοειδικά δίκτυα, η πίεσή του μέσα στα τριχοειδή αγγεία του σπειράματος αυξάνεται πολύ, σύμφωνα με τις αρχές της



υδροδυναμικής. Τούτο είναι απαραίτητο για τη λειτουργία του νεφρικού σωματίου και την παραγωγή των ούρων.

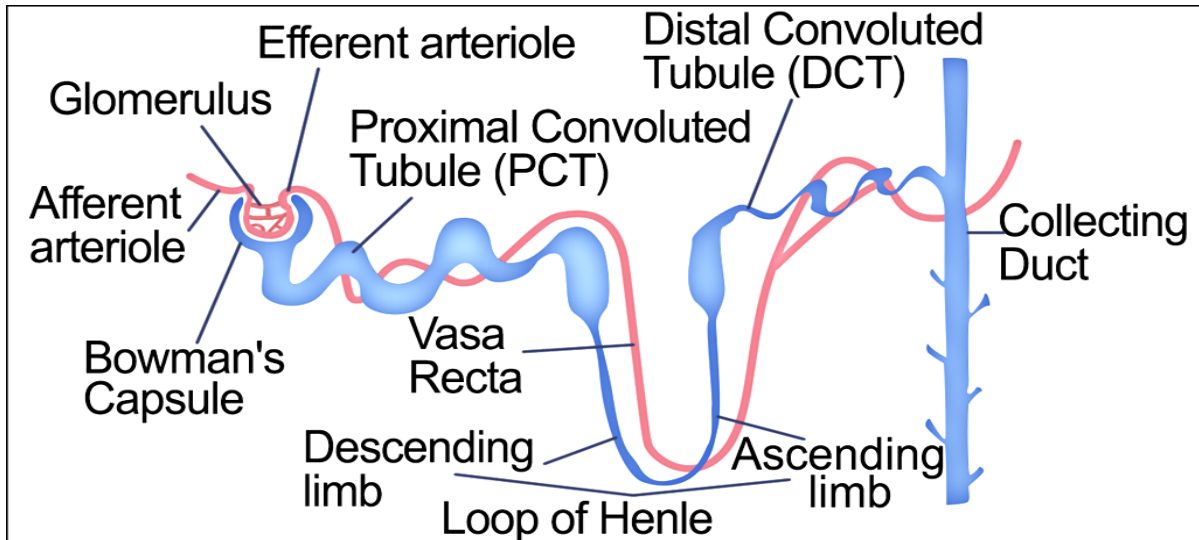


**Εικόνα 1:** Σχηματική απεικόνιση της δομής του νεφρού. (<http://cnx.org/content/col11496/1.6>)

Βασική δομική και λειτουργική μονάδα του νεφρού είναι ο νεφρώνας (*nephron*). Καθένας νεφρός υπολογίζεται πως περιέχει περίπου ένα εκατομμύριο νεφρώνες. Κάθε νεφρώνας αποτελείται από το νεφρικό σωματίο και από το ουροφόρο σωληνάριο. Το νεφρικό σωματίο αποτελεί διηθητικό ‘οργανίδιο’ και περιέχει ένα θύσανο αλληλοσυνδεμένων τριχοειδών βρόχων ο οποίος ονομάζεται νεφρικό σπείραμα. Το σπείραμα περιβάλλεται από την κάψα του Bowman που περικλείει τον χώρο του Bowman. Το σπείραμα μαζί με τον χώρο του Bowman συναποτελούν το νεφρικό σωματίο.

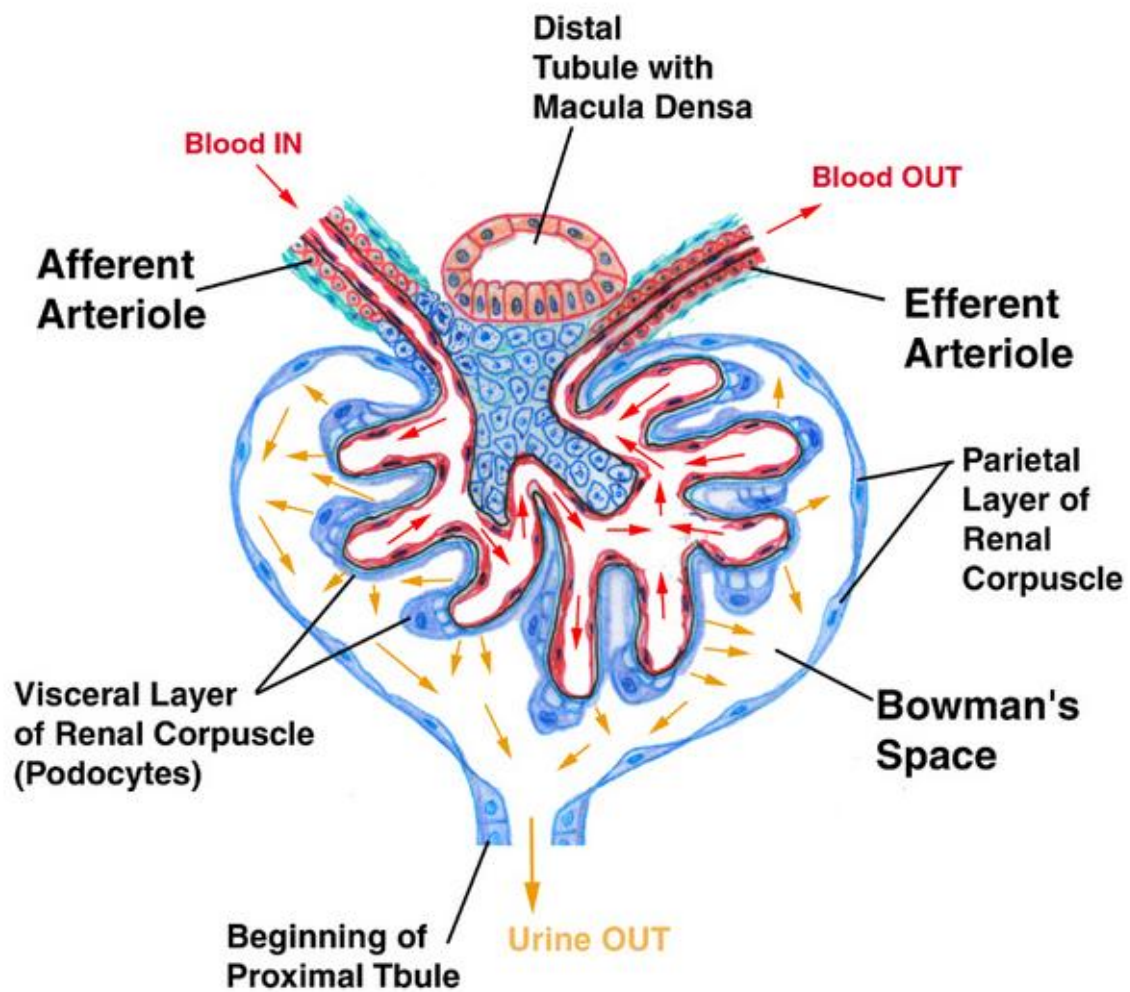
Το ουροφόρο σωληνάριο αποτελεί φυσική προέκταση του νεφρικού σωματίου και πιο συγκεκριμένα του έξω πετάλου της κάψας του Bowman (*Bowman’s Capsule*), και είναι ένας στενός κύλινδρος φτιαγμένος από μία στιβάδα επιθηλιακών κυττάρων που στηρίζονται πάνω σε βασική μεμβράνη. Τα επιθηλιακά αυτά κύτταρα παρουσιάζουν διαφορές τόσο στη δομή όσο και στην λειτουργία ανάλογα με τη θέση τους πάνω στο νεφρικό σωληνάριο. Από λειτουργικής άποψης το νεφρικό σωληνάριο διακρίνεται σε τέσσερα τμήματα (Εικόνα 2). Το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο (*proximal tubule*) στο οποίο εισρέει το διήθημα από την κάψα του Bowman, την αγκύλη του Henle που είναι ένα σύστημα αντιρροής που αποτελείται από το κατιόν (*descending limb*) και το ανιόν σκέλος (*ascending limb*), το άπω εσπειραμένο σωληνάριο (*distal tubule*) και το αθροιστικό

σωληνάριο (*collecting tubule*). Σε κάθε διακριτό τμήμα κατά μήκος του σωληναρίου ενός νεφρώνα επιτελούνται διαφορετικές λειτουργίες.



**Εικόνα 2:** Σχηματική απεικόνιση του νεφρώνα. Από το νεφρικό σωματίο (*glomerulus*) ξεκινάει το ουροφόρο σωληνάριο. Αυτό αποτελείται κατά σειρά από το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο (*proximal convoluted tubule*), την αγκύλη του Henle (*loop of Henle*), το άπω εσπειραμένο σωληνάριο (*distal convoluted tubule*) και το αθροιστικό σωληνάριο (*collecting tubule*). Τα νεφρικά σωματία μαζί με τα εγγύς και άπω σωληνάρια συγκεντρώνονται στην περιοχή του νεφρού που ονομάζεται φλοιός (*cortex*), ενώ η αγκύλη του Henle και τα αθροιστικά σωληνάρια βυθίζονται στο μυελό (*medulla*)

Στο νεφρικό σωματίο διακρίνονται τέσσερις βασικές κατηγορίες κυττάρων με διαφορετικό ρόλο η καθεμία: τα ενδοθηλιακά κύτταρα (*endothelium*), τα ποδοκύτταρα που είναι εξειδικευμένα επιθηλιακά κύτταρα, τα μεσαγγειακά κύτταρα και τα τοιχωματικά κύτταρα (*parietal cells*) (Εικόνα 3).



*Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση του νεφρικού σωματίου (<http://physiologyplus.com/filtration-membrane-of-the-kidney/>)*

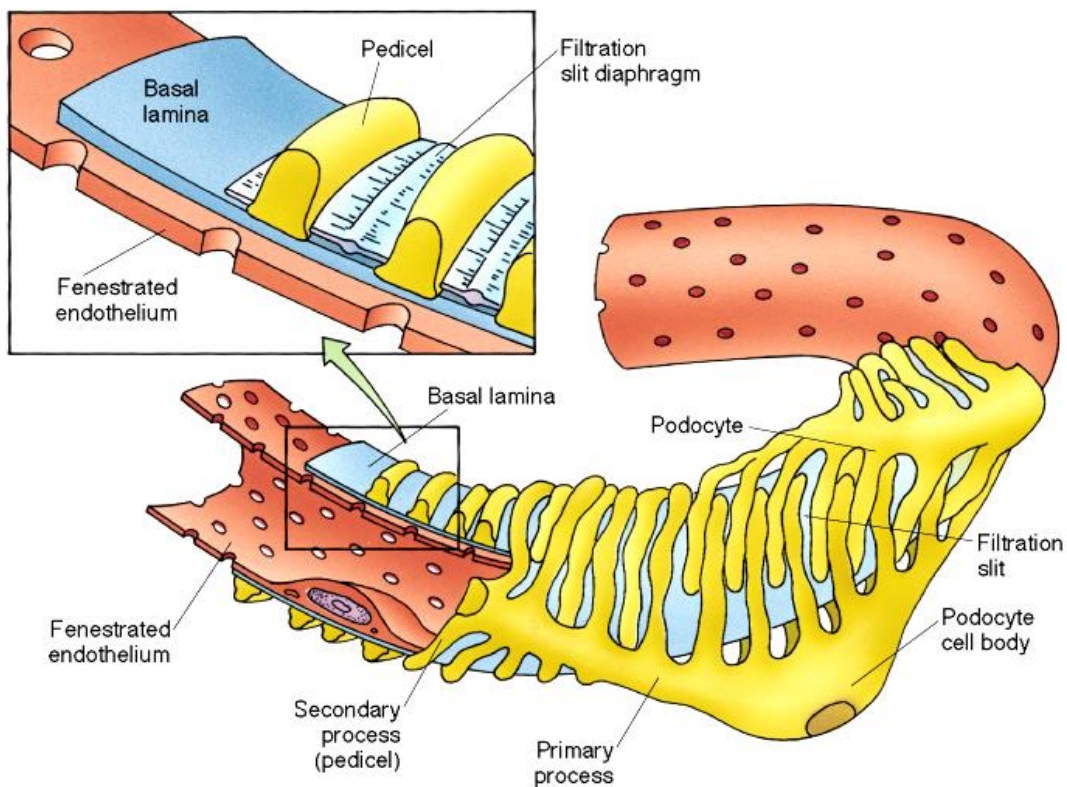
### 1.1.2 Λειτουργία του νεφρώνα: Από τη σπειραματική διήθηση στην παραγωγή ούρων

Κάθε νεφρός έχει περίπου ένα εκατομμύριο νεφρώνες αλλά δεν λειτουργούν διαρκώς όλοι, παρά μόνο οι μισοί. Στη διάρκεια του 24ώρου μπαίνουν σε λειτουργία όλοι οι νεφρώνες εκ περιτροπής. Οι λειτουργίες που επιτελούνται στους νεφρώνες περιλαμβάνουν την σπειραματική διήθηση, την επεξεργασία του διηθήματος και την παραγωγή των ούρων.

Το νεφρικό σωματίο αποτελεί τη θέση όπου φιλτράρεται το αίμα. Κάθε σπείραμα τροφοδοτείται με αίμα από ένα προσαγωγό αρτηρίδιο. Καθώς το αίμα ρέει μέσα στο

σπείραμα ένα μέρος του πλάσματος (περίπου το 20%) διηθείται προς τον χώρο του Bowman, ενώ το υπόλοιπο εξέρχεται από το σπείραμα μέσω του απαγωγού αρτηριδίου. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται σπειραματική διήθηση και το παραγόμενο υπερδιήθημα πρόουρο. Το υγρό αυτό δεν περιέχει κύτταρα και ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, όπως οι πρωτεΐνες, περιέχει μικρού και μέσου μοριακού βάρους ουσίες συμπεριλαμβανομένων και των ουραιμικών τοξινών. Μέσω της σπειραματικής διήθησης ο οργανισμός απομακρύνει τοξικές ουσίες, δείκτης των οποίων είναι η ουρία και η κρεατινίνη, που βρίσκονται διαλυμένες στο πρόουρο, αλλά μαζί μ' αυτές χάνει και σημαντικό όγκο νερού (180 L ημερησίως) καθώς και διάφορα συστατικά που του είναι χρήσιμα (γλυκόζη, νάτριο, κάλιο, ασβέστιο κ.ά.). Τα συστατικά αυτά καθώς και το νερό σε ποσοστό 99% επιστρέφουν στην κυκλοφορία με τη διαδικασία της επαναρρόφησης η οποία γίνεται στα ουροφόρα σωληνάκια.

Όπως είδαμε, το νεφρικό σωματίο αποτελείται από το αγγειώδες σπείραμα και την κάψα του Bowman. Το αίμα φτάνει στο σπείραμα με υψηλή πίεση και εισέρχεται στην ουροφόρα κοιλότητα της κάψας του Bowman που έχει χαμηλότερη πίεση. Η διαφορά αυτή των πιέσεων στους δυο χώρους προκαλεί διήθηση του αίματος προς την πλευρά της χαμηλότερης πίεσης, δηλαδή την ουροφόρα κοιλότητα. Η υψηλή ωσμωτική πίεση οφείλεται στις ουσίες, που βρίσκονται διαλυμένες μέσα στο πρώτο διήθημα, στο πρόουρο. Το αίμα που εισέρχεται στο σπείραμα διαχωρίζεται από το χώρο του Bowman από ένα φραγμό διήθησης ο οποίος αποτελείται από τρεις στιβάδες: τη στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών αγγείων του σπειράματος, τη στιβάδα επιθηλιακών κυττάρων της κάψας του Bowman (ποδοκύτταρα) και τη βασική μεμβράνη που βρίσκεται ανάμεσα στις δυο προαναφερθείσες στιβάδες (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4:** Σχηματική απεικόνιση του φραγμού διήθησης στο σπείραμα. Τα ποδοκύτταρα (podocytes) με τις ποδοειδείς προεκβολές τους (primary & secondary processes) περιβάλλουν τα τριχοειδή αγγεία. Οι δευτερογενείς προεκβολές διαπλέκονται μεταξύ τους σχηματίζοντας το σχισμοειδές διάφραγμα (slit diaphragm) όπου φιλτράρεται το πλάσμα. Τα ποδοκύτταρα μαζί με το πορώδες ενδοθήλιο (fenestrated endothelium) και τη βασική μεμβράνη συνθέτουν τον διηθητικό φραγμό του σπειράματος.

Το νερό, τα ιόντα και μικρομοριακές ενώσεις διέρχονται ελεύθερα από τον φραγμό, ενώ η διήθηση μακρομορίων είναι εκλεκτική ανάλογα με το μέγεθος, το σχήμα και το φορτίο τους. Έτσι, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών του σπειράματος μαζί με το σχισμοειδές διάφραγμα (slit diaphragm) και την σπειραματική βασική μεμβράνη αποτελούν το σημείο όπου γίνεται η διήθηση του πλάσματος και αρχίζει ουσιαστικά ο σχηματισμός των ούρων. Το σχισμοειδές διάφραγμα είναι η βασική δομή που καθορίζει την εκλεκτικότητα του φραγμού ως προς το μέγεθος. Αποτελεί μία εξειδικευμένη μορφή διακυττάριας σύνδεσης και η δημιουργία της είναι αποτέλεσμα ειδικών μορφογενετικών σταδίων που παρατηρούνται στο σπειραματικό επιθήλιο. Κατά τα στάδια αυτά πραγματοποιείται αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού των ποδοκυττάρων και έκφραση

ειδικών πρωτεϊνών που εντοπίζονται σε ειδικές κυτταρικές θέσεις. Κατά τη διάρκεια διέλευσης του πειραματικού διηθήματος μέσα από τα σωληνάρια η σύνθεσή του μεταβάλλεται με μετακίνηση ουσιών από τα σωληνάρια προς τα περισωληναριακά τριχοειδή (σωληναριακή επαναρρόφηση) και αντίστροφα (σωληναριακή έκκριση). Καθημερινά παράγονται 180-200 λίτρα διηθήματος (πρόουρου) στα αγγειώδη σπειράματα. Από αυτά, το 99% επαναρροφάται και μόνο το 1% αποβάλλεται με τη μορφή ούρων. Το μεγαλύτερο μέρος του πειραματικού διηθήματος επαναρροφάται στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο ενώ η υπόλοιπη ποσότητα επαναρροφάται στα υπόλοιπα τμήματα του νεφρώνα (αγκύλη του Henle, άπω σωληνάριο και αθροιστικό σωληνάριο). Η επαναρρόφηση γίνεται είτε μέσω του μηχανισμού της ωσμωρύθμισης είτε με την ταυτόχρονη ενεργή μεταφορά ιόντων διαμέσου των μεμβρανών. Εκτός από νερό στο εγγύς σωληνάριο επαναρροφώνται ουσίες όπως η γλυκόζη και τα αμινοξέα καθώς και διάφορα ιόντα (Νατρίου, Χλωρίου, Μαγνησίου, Φωσφορικά, Διττανθρακικά).

Προκειμένου να παραχθεί η τελική μορφή των ούρων θα πρέπει το αρχικό διήθημα να συμπυκνωθεί. Η συμπύκνωση μπορεί να γίνει στην αγκύλη του Henle με μία διαδικασία που ονομάζεται πολλαπλασιασμός αντιρροής και στο αθροιστικό σωληνάριο με την επίδραση της αντιδιουρητικής ορμόνης (ADH). Η ADH ελέγχει την διαπερατότητα των αθροιστικών πόρων ανάλογα με την ανάγκη του οργανισμού να αποβάλλει νερό με τα ούρα ή όχι. Στην αγκύλη του Henle εκτός από την συμπύκνωση γίνεται και επαναρρόφηση νερού και ιόντων νατρίου και χλωρίου ενώ τέλος, το άπω εσπειραμένο σωληνάριο είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο της οξεοβασικής ισορροπίας και έχει την ικανότητα να αντλεί ιόντα αντίθετα από την κλίση συγκέντρωσης. Η όλη διαδικασία της παραγωγής των ούρων είναι περίπλοκη και περιλαμβάνει πολλά σημεία ελέγχου που ρυθμίζουν κάθε φορά τη σύσταση των ούρων ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού.

Το πρόουρο βρίσκεται στο σωληνάριο υπό υψηλή πίεση ενώ το αίμα στα τριχοειδικά δίκτυα του απαγωγού αρτηριδίου που περιβάλλουν το σωληνάριο υπό χαμηλή πίεση. Η διαφορά της πίεσης σπρώχνει το διάλυμα προς τα τριχοειδή των δικτύων. Όμως, το διάλυμα που περνά μέσα στα τριχοειδή δεν περιέχει την ουρία, η οποία αδυνατεί να περάσει την ειδική κατασκευή του τοιχώματος των τριχοειδών και του σωληναρίου. Έτσι, το τοίχωμα συγκρατεί την ουρία (διαλυμένη σε μια μικρή ποσότητα νερού) μέσα στον αυλό του ουροφόρου σωληναρίου, και επαναρροφά το μεγαλύτερο όγκο νερού από το πρόουρο μαζί με τα χρήσιμα συστατικά, αποδίδοντάς τα πάλι στην κυκλοφορία (μέσα στα τριχοειδή). Στη φάση αυτή γίνεται και μια ανταλλαγή ηλεκτρολυτικών ιόντων μεταξύ πρόουρου και αίματος και έτσι, ταυτόχρονα με την παραγωγή των ούρων και την αποβολή

της ουρίας, διατηρείται η ισορροπία των ηλεκτρολυτών και του όγκου των υγρών του σώματος. Μετά την ολοκλήρωση της επαναρρόφησης τα ούρα περνούν στο τελικό σωληνάριο κι από εκεί στο αθροιστικό. Μικρές ποσότητες νερού επαναρροφώνται και σ' αυτά τα τμήματα του ουροφόρου σωληναρίου. Ό,τι απομένει περνά στη νεφρική θηλή και μετά στο νεφρικό κάλυκα ο οποίος είναι η αρχή της αποχετευτικής μοίρας του ουροποιητικού συστήματος.

Με τα ούρα ο οργανισμός απομακρύνει ουσίες που είναι άχρηστες ή βλαβερές για την λειτουργία του, όπως μεταβολικά κατάλοιπα φαρμάκων και τοξικών ουσιών. Κακή λειτουργία του ουροποιητικού συστήματος συνεπάγεται σοβαρές διαταραχές του οργανισμού από τη συσσώρευση πολλών άχρηστων ουσιών στο αίμα.

## 1.2 Χρόνια Νεφρική Νόσος

---

Χρόνια Νεφρική Νόσος (Chronic Kidney Disease, CKD) αποτελεί οποιαδήποτε κατάσταση κατά την οποία οι νεφροί αδυνατούν να εκτελέσουν φυσιολογικά τις βασικές τους λειτουργίες (καθαρισμός αίματος, απέκκριση τοξικών ουσιών και παραπροϊόντων μεταβολισμού, παραγωγή ορμονών, ρύθμιση pH αίματος) σε διάφορο βαθμό και για διάστημα μεγαλύτερο των τριών μηνών. Η Χρόνια Νεφρική Νόσος (XNN) συνοδεύεται από λειτουργικές διαταραχές, όπως η πρωτεϊνουρία (αποβολή πρωτεΐνης στα ούρα) και η αιματουρία (αποβολή αίματος), και δομικές διαταραχές με ή χωρίς μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (Glomerular Filtration Rate, GFR). Ιστολογικά χαρακτηρίζεται από την παρουσία σπειραματικής σκλήρυνσης, ατροφίας των ουροφόρων σωληναρίων και την εμφάνιση ίνωσης.

Σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης KDIGO CKD 2012, η λειτουργία των νεφρών προσδιορίζεται από τον ρυθμό της σπειραματικής διήθησης GFR και από τον λόγο αλβουμίνης/κρεατινίνης ACR (albumin-creatinine ratio) που προσδιορίζει τα επίπεδα της αλβουμινουρίας. Ο GFR αποτελεί μέχρι και σήμερα τον καλύτερο διαθέσιμο δείκτη παρακολούθησης της νεφρικής λειτουργίας και διάγνωσης της XNN. Ορίζεται ως η συνολική ποσότητα πύρου που φιλτράρεται από όλους τους λειτουργικούς νεφρώνες ανά μονάδα χρόνου. Ο φυσιολογικός GFR στα νεαρά ενήλικα άτομα είναι περίπου 125 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>. Αν και ο ορισμός και η ταξινόμηση της XNN σε στάδια έχουν εξελιχθεί με την πάροδο του χρόνου, η τρέχουσα διεθνής ταξινόμηση ορίζει ως XNN την μειωμένη λειτουργία νεφρών που εμφανίζεται με GFR < 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> ή με δείκτες νεφρικής βλάβης ή και τα δύο, με διάρκεια τουλάχιστον 3 μηνών ανεξάρτητα από την υποκείμενη αιτία που προκαλεί την βλάβη στο νεφρό [1]. Έτσι, ανάλογα με τα επίπεδα της σπειραματικής διήθησης η XNN κατηγοριοποιείται σε πέντε στάδια με το τρίτο στάδιο G3 να υποδιαιρείται σε δύο επιμέρους στάδια G3a και G3b, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5. Επιπλέον, τα επίπεδα της αλβουμινουρίας ταξινομούνται σε τρία στάδια (A1, A2, A3) σύμφωνα με τον δείκτη ACR. Το τελευταίο στάδιο G5 το οποίο ορίζεται από GFR < 15 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> αποτελεί την χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου και οι ασθενείς σε αυτό το στάδιο θα χρειασθούν αργά ή γρήγορα υποστήριξη της νεφρικής τους λειτουργίας με εξωσωματική κάθαρση (αιμοκάθαρση ή περιτοναϊκή κάθαρση) ή μεταμόσχευση νεφρού [2-5].



Prognosis of CKD and by eGFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories Urine ACR (mg/mmol) Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal male < 2.5 female < 3.5	Microalbuminuria male 2.5 – 25 female 3.5 – 35	Macroalbuminuria male > 25 female > 35
eGFR categories (mL/min/1.73m <sup>2</sup> ) Description and range	G1	Normal or high	>90			
	G2	Mildly decreased	60–89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45–59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30–44			
	G4	Severely decreased	15–29			
	G5	Kidney failure	<15			

■ low risk if no other markers of kidney disease, no CKD) 
 ■ Moderately increased risk 
 ■ high risk 
 ■ very high risk

**Εικόνα 5:** Στάδια της ΧΝΝ όπως προκύπτουν από την κατηγοριοποίηση με βάση τον ρυθμό της σπειραματικής διήθησης (eGFR) και τα επίπεδα της αλβουμινουρίας. Από βιβλιογραφική αναφορά [6]

Η συχνότητα της ΧΝΝ στον γενικό πληθυσμό είναι πολύ δύσκολο να προσδιοριστεί καθώς τα αρχικά στάδια της νόσου είναι ασυμπτωματικά και ο GFR συχνά υπολογίζεται με διαφορετικές μεθοδολογίες. Ωστόσο, ο επιπολασμός της ΧΝΝ κυμαίνεται περίπου στο 11-13% του πληθυσμού στις αναπτυγμένες χώρες. Επομένως, υπολογίζεται πως το 11-13% του πληθυσμού ανήκει σε κάποιο από τα στάδια της νεφρικής νόσου. Το κόστος θεραπείας των ασθενών με ΧΝΝ είναι τεράστιο. Ενδεικτικά, μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής δαπανώνται περισσότερα από 48 δισεκατομμύρια δολάρια το χρόνο για θεραπεία. Ακόμα πιο σοβαρό από το κόστος είναι το γεγονός ότι στις αναπτυσσόμενες χώρες η εξωγενής υποστήριξη της νεφρικής λειτουργίας όπως η αιμοκάθαρση δεν είναι ευρέως διαδεδομένη με αποτέλεσμα η εμφάνιση της νεφρικής νόσου τελικού σταδίου να ισοδυναμεί με τον θάνατο.

Οι αιτίες παγκοσμίως που προκαλούν ΧΝΝ ποικίλλουν. Οι πιο κοινές πρωτοπαθείς νόσοι και το σχετικό ποσοστό τους που προκαλούν ΧΝΝ και τελικά οδηγούν σε νεφρική ανεπάρκεια είναι οι ακόλουθες [7] :

- Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II (30%-50%)
- Αρτηριακή υπέρταση (27.2%)

- Πρωτογενείς σπειραματονεφρίτιδες (8.2%)
- Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I (3.9%)
- Διάμεση σωληναριακή νεφρίτιδα (3.6%)
- Συγγενή νοσήματα (πολυκυστική νόσος νεφρών, σύνδρομο Alport) (3.1%)
- Δευτερογενής σπειραματονεφρίτιδα ή αγγειίτιδα (2.1%)

Όπως φαίνεται και παραπάνω, οι δύο κύριες αιτίες που προκαλούν την ΧΝΝ είναι ο διαβήτης (τύπου I και II) και η υπέρταση και ευθύνονται περίπου για το 2/3 των περιπτώσεων εμφάνισης ΧΝΝ παγκοσμίως.

### 1.3 Υπέρταση

---

Η υπέρταση είναι μια χρόνια πάθηση κατά την οποία η πίεση στο αρτηριακό σκέλος της κυκλοφορίας είναι αυξημένη. Κατά την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Υπέρτασης, το άτομο είναι υπερτασικό, εάν η αρτηριακή πίεση στο ιατρείο είναι  $> 140/90$  mmHg.

Η υπέρταση κατηγοριοποιείται σε δύο τύπους ανάλογα με την αιτία που προκαλεί την εμφάνισή της. Στο 90-95% των περιπτώσεων δεν υπάρχει κάποιο προφανές υποκείμενο ιατρικό αίτιο που να δικαιολογεί την αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Σε αυτές τις περιπτώσεις η κατάσταση ονομάζεται πρωτοπαθής ή ιδιοπαθής υπέρταση και είναι μια πολυπαραγοντική νόσος, που προκαλείται από την αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Το υπόλοιπο 5-10% των περιπτώσεων υπέρτασης οφείλονται σε παθολογικές καταστάσεις, που επηρεάζουν τους νεφρούς (νεφρίτιδες, πολυκυστική νόσος νεφρών), τις αρτηρίες (νεφραγγειακή υπέρταση, στένωση ισθμού αορτής), την καρδιά και το ενδοκρινικό σύστημα (υπεραλδοστερονισμός φαιοχρωμοκύττωμα κλπ) και κατηγοριοποιούνται, ως δευτεροπαθής υπέρταση.

Είναι σημαντικό να τονιστεί πως ακόμα και η μέτρια αύξηση της αρτηριακής πίεσης στους ανθρώπους σχετίζεται με μειωμένο προσδόκιμο ζωής. Έτσι, η υπέρταση αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για το έμφραγμα του μυοκαρδίου, την καρδιακή ανεπάρκεια, το εγκεφαλικό, τα ανευρύσματα αρτηριών και την εμφάνιση χρόνιας νεφρικής νόσου.

#### 1.3.1 Επιδημιολογικά δεδομένα

---

Η υπέρταση αποτελεί ένα παγκόσμιο φαινόμενο και για το λόγο αυτό έχει χαρακτηριστεί, ως ο συχνότερος παράγοντας κινδύνου, που μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο. Υπολογίζεται πως πλήττει περίπου 1 δισεκατομμύριο ανθρώπους δηλαδή περίπου το 26% του ενήλικου πληθυσμού παγκοσμίως. Η υπέρταση δεν εμφανίζεται μόνο στις αναπτυγμένες χώρες, αλλά και στις αναπτυσσόμενες. Επιπλέον, εμφανίζεται συχνότερα στους άντρες σε σύγκριση με τις γυναίκες. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το 2012 ο επιπολασμός της νόσου εκτιμήθηκε 29,2% στους άντρες και 28,4% στις γυναίκες.

Θα πρέπει να σημειωθεί πως παρόλο που η υπέρταση έχει μεγάλο επιπολασμό κυρίως σε άτομα τις τρίτης ηλικίας, τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται μια αύξηση των κρουσμάτων σε νεαρούς ενήλικες και εφήβους [8-10]. Αυτό οφείλεται στην αύξηση των

παραγόντων κινδύνου στους νέους, όπως η παχυσαρκία, η υπερβολική πρόσληψη νατρίου, η μειωμένη σωματική δραστηριότητα, ο σακχαρώδης διαβήτης και η νεφρική νόσος. Όμως, και ψυχοκοινωνικοί παράγοντες μπορεί να ευθύνονται για την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της υπέρτασης σε νεαρά άτομα. Μετά την παχυσαρκία, οι νεφροπάθειες αποτελούν την δεύτερη πιο συχνή (60-70%) αιτία της υπέρτασης στα παιδιά. Πάντως και στους εφήβους η συνηθέστερη μορφή υπέρτασης είναι η πρωτοπαθής ή ιδιοπαθής υπέρταση, σε ποσοστό 90–95% [11].

### **1.3.2. Υπέρταση και Νεφρός**

---

Ο νεφρός αποτελεί ένα από τα όργανα στόχους της αρτηριακής υπέρτασης. Η υπέρταση αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα αιτία, μετά το σακχαρώδη διαβήτη, που οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Παρά το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της ανάπτυξης και της εξέλιξης της νεφρικής βλάβης λόγω της υψηλής αρτηριακής πίεσης, οι μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτή παραμένουν αδιευκρίνιστοι.

Η υπέρταση προκαλεί ανεπανόρθωτες βλάβες στη δομή και την λειτουργία των νεφρών. Αντίστροφα, οι νεφρικές παθήσεις μπορεί να προκαλέσουν υπέρταση και μέσω αυτής επιδείνωση των νεφρικών βλαβών και περαιτέρω επιβάρυνση της νεφρικής λειτουργίας. Έτσι, δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος όπου η υπέρταση είναι η αιτία και το αποτέλεσμα της νεφρικής δυσλειτουργίας.

Πολλοί παράγοντες συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία. Η Αγγειοτενσίνη II μέσω της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και της υπερέκφρασης των επιφανειακών μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1 συμβάλλει στην πρόκληση της νεφρικής βλάβης. Η έκφραση των μορίων προσκόλλησης διεγείρεται από την ενδοθηλίνη-1, το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, την αλδοστερόνη, φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χυμοκίνες όπως και από διάφορους άλλους αυξητικούς παράγοντες, το οξειδωτικό στρες και παράγοντες με χημειοτακτική δράση όπως η οστεοποντίνη [12-14].

### **1.3.3 Υπερτασική νεφροσκλήρυνση**

---

Ο όρος ‘Υπερτασική Νεφροσκλήρυνση χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις προκαλούμενες από την υπέρταση νεφρικές βλάβες και ορίζει την κατάσταση αυτή ως μια μη διαβητική νεφροπάθεια που συνοδεύεται από χρόνια υπέρταση με ή χωρίς

λευκωματουρία. Για την πρόκληση νεφρικής βλάβης σημαντικός παράγοντας θεωρείται όχι μόνο η βαρύτητα της υπέρτασης αλλά και η διάρκειά της. Η διάρκεια της υπέρτασης συσχετίζεται τόσο με τις ενδοθηλιακές και τις σπειραματικές, όσο και τις σωληναριακές βλάβες. Η παρατεταμένη υψηλή αρτηριακή πίεση οδηγεί σε νεφρική βλάβη με παθολογοανατομικές αλλοιώσεις μη ειδικές. Η ιστολογική εικόνα χαρακτηρίζεται από αρτηριδιοσκλήρυνση, σπειραματοσκλήρυνση και ίνωση του διάμεσου ιστού χωρίς ανοσοεναποθέσεις. Η συνηθέστερη παθολογοανατομική βλάβη αφορά υαλίνωση των αρτηριδίων, εστιακή ή τμηματική πάχυνση των τοιχωμάτων, εναπόθεση θεμελίου ουσίας, ρίκνωση και τελικά ουλοποίηση του σπειράματος.

Η νεφρική βλάβη που συνδέεται με την αρτηριακή υπέρταση είναι δυνατό να εξελίσσεται προοδευτικά και να οδηγεί τελικά σε νεφρική ανεπάρκεια. Η σχέση της αρτηριακής υπέρτασης με τη νεφρική βλάβη έχει ήδη διαπιστωθεί από μεγάλες μελέτες αναφοράς. Η μελέτη Hypertension Detection and Follow up Program σε 10.940 ασθενείς με διάστημα παρακολούθησης 5 ετών, απέδειξε ότι η υπέρταση αποτελεί παράγοντα κινδύνου για επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας [15]. Επιπλέον, στην επιδημιολογική μελέτη, MRFIT (Multiple Risk Factor Intervention Trial) σε 332.544 άτομα, χωρίς πρωτοπαθή νεφρική νόσο, παρατηρήθηκε στενή σχέση μεταξύ συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης και εξέλιξης σε τελικού σταδίου νεφροπάθεια, σε διάστημα παρακολούθησης 16 ετών. Η συγκεκριμένη μελέτη αποτέλεσε την κυριότερη κλινική μελέτη, που τεκμηρίωσε τη σχέση του ρυθμού έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας με την αρτηριακή υπέρταση [16,17].

Στην υπερτασική νεφροσκλήρυνση οι ειδικές νεφρικές βλάβες αφορούν τις μέσου και μικρού μεγέθους αρτηρίες, έως και τα τελικά αρτηρίδια των νεφρώνων. Αναπτύσσεται πάχυνση του έσω χιτώνα, μέσω πολλαπλασιασμού των ινομοβλαστών και εναπόθεσης κολλαγόνου καθώς και διπλασιασμός του πάχους του έσω ελαστικού πετάλου. Επίσης, παρατηρείται πάχυνση του αρτηριακού τοιχώματος από ηωσινόφιλες εναποθέσεις και υαλίνη με τελικό αποτέλεσμα την αρτηριοσκλήρυνση. Ωστόσο, οι αλλοιώσεις που προκαλεί η υπέρταση στο νεφρό δεν περιορίζονται μόνο στα αγγεία αλλά εντοπίζονται και στο υπόλοιπο νεφρικό παρέγχυμα. Έτσι, χαρακτηριστικά ευρήματα σοβαρής αρτηριακής υπέρτασης αποτελούν η σπειραματοσκλήρυνση αλλά και η διάμεση ίνωση και σωληναριακή ατροφία η οποία χαρακτηρίζεται ως δευτεροπαθής.

Επιπλέον, η υπερτασική νεφροσκλήρυνση είναι βέβαιο πως δεν οφείλεται σε μία μοναδική αιτία αλλά αποτελεί πολυπαραγοντική πάθηση [18]. Όμως, οι μηχανισμοί που οδηγούν στη νεφροσκλήρυνση παραμένουν άγνωστοι. Καθώς η λήψη βιοψίας από

ασθενείς με νεφρική νόσο είναι επίπονη διαδικασία, έχουν αναπτυχθεί ζωικά μοντέλα τα οποία αναπτύσσουν βλάβες παρόμοιες με αυτές υπέρτασικών ανθρώπων, και χρησιμοποιούνται ευρέως προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της υπέρτασης στην ΧΝΝ και να αποσαφηνιστούν οι παθογενετικοί μηχανισμοί της υπέρτασης νεφροσκλήρυνσης [19].

## 1.4 Πειραματικά μοντέλα υπέρτασης

---

Η χρήση ζωικών προτύπων στην έρευνα αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την κατανόηση της φυσιολογίας και της παθοφυσιολογίας του νεφρού. Η έρευνα σε ζωικά μοντέλα νεφρικών παθήσεων και χρόνιας νεφρικής νόσου έχει βοηθήσει στην κατανόηση θεμελιωδών εννοιών της βιολογίας των νεφρών καθώς και των επιπτώσεων των συστηματικών νοσημάτων στην νεφρική λειτουργία. Σε επίπεδο βασικής έρευνας, τα ζωικά μοντέλα χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση νέων μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών ανάπτυξης ασθενειών αλλά και για την δοκιμή πιθανών νέων θεραπειών.

Η ανθρώπινη υπέρταση είναι μια πολύπλοκη πολυπαραγοντική νόσος που όπως αναφέρθηκε προηγουμένως επηρεάζεται από γενετικούς αλλά και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Διάφορα πειραματικά μοντέλα υπέρτασης έχουν αναπτυχθεί με σκοπό τη μελέτη της ανθρώπινης υπέρτασης. Τα μοντέλα αυτά έχουν συμβάλει στη διαλογή πιθανών αντι-υπερτασικών φαρμάκων και στην κατανόηση των μηχανισμών που ευθύνονται για την ανάπτυξη και την εξέλιξη της υπέρτασης. Δεδομένου ότι τα ζωικά μοντέλα υπέρτασης μιμούνται την ανθρώπινη υπέρταση, πολλά από αυτά έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας τους αιτιολογικούς παράγοντες που προκαλούν την ανθρώπινη υπέρταση, όπως η υπερβολική λήψη αλατιού, η υπερδραστηριότητα του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (RAAS) και η γενετική προδιάθεση. [20].

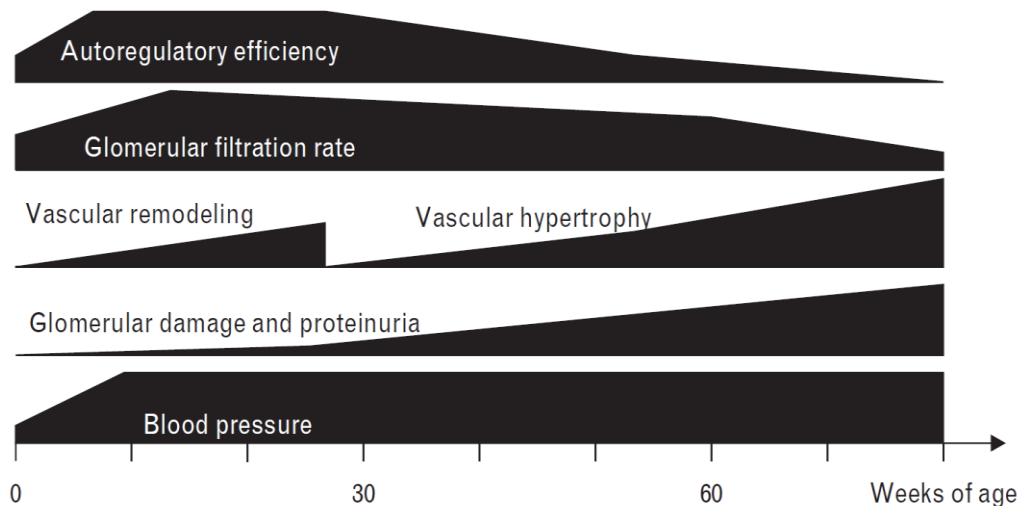
Έτσι, έχουν αναπτυχθεί πολλά υπερτασικά μοντέλα τα οποία κατηγοριοποιούνται με βάση την αιτία που προκαλεί την υπέρταση. Τα ζωικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της δευτεροπαθούς υπέρτασης που προκαλείται από νεφρικές παθήσεις όπως η νεφρική αρτηριακή στένωση (RAS, renal arterial stenosis) είναι τα 2K-1C (2 kidneys-1 clip hypertension model), 1K-1C (1 kidney-1 clip hypertension model) και 2K-2C (2 kidney-2 clip hypertension model) [21,22]. Για τη μελέτη της πρωτοπαθούς υπέρτασης έχουν αναπτυχθεί ζωικά μοντέλα τα οποία βασίζονται στην χορήγηση φαρμακολογικών παραγόντων για την πρόκληση υπέρτασης όπως ο αναστολέας συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου (NOS, nitric oxide synthase), το DOCA (deoxycorticosterone acetate) και οι ενεργοποιητές του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (RAAS). Επιπλέον, πολλά υπερτασικά μοντέλα περιλαμβάνουν μοριακά, διαγονιδιακά και συγγενικά στελέχη που σε συνδυασμό με τις τεχνικές αποσιώπησης γονιδίων (gene knockout techniques) έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποσαφήνιση των μηχανισμών που ευθύνονται για την εμφάνιση της υπέρτασης. Παραδείγματα ζωικών μοντέλων υπέρτασης αποτελούν τα Fawn

hooded hypertensive rats [23], τα Sprague-Dawley rats [24], τα Dahl salt-sensitive (DS) rats [25] και τα Spontaneously Hypertensive Rats [26].

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε το υπερτασικό μοντέλο Spontaneously Hypertensive Rat το οποίο αναλύεται στην επόμενη ενότητα.

#### 1.4.1. Υπερτασικό μοντέλο SHR (Spontaneously Hypertensive Rat)

Το μοντέλο Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα και καλά μελετημένα πειραματικά μοντέλα υπέρτασης με πάνω από 18.000 αναφορές στο PubMed [27,28]. Το μοντέλο αυτό είναι γενετικό και αναπτύχθηκε το 1963 από τους Okamoto και Aoki από την διασταύρωση Wistar Kyoto επίμυων και την επιλογή των ατόμων της θυγατρικής γενιάς που παρουσίαζαν την υψηλότερη αρτηριακή πίεση [26]. Το χρονοδιάγραμμα της ανάπτυξης υπέρτασης και των επιπτώσεών της στο μοντέλο SHR φαίνεται στην Εικόνα 6.



**Εικόνα 6:** Χρονοδιάγραμμα της ανάπτυξης της υπέρτασης και της εμφάνισης των νεφρικών βλαβών στο μοντέλο SHR από την γέννηση έως την 80<sup>η</sup> εβδομάδα της ζωής τους. Η υπέρταση αναπτύσσεται από τις πρώτες 10 εβδομάδες ενώ και η αναδιαμόρφωση των αγγείων εμφανίζεται πολύ νωρίς στην ανάπτυξη. Από βιβλιογραφική αναφορά [28].



Τα αρσενικά SHR αποτελούν ένα καθιερωμένο μοντέλο μελέτης της ανθρώπινης υπέρτασης και χρησιμοποιούνται για την δοκιμή νέων αντι-υπερτασικών σκευασμάτων [29]. Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα του μοντέλου είναι ότι η υπέρταση εμφανίζεται σε νεαρή ηλικία και οι ιστολογικές βλάβες που προκαλεί είναι παρόμοιες με εκείνες σε ασθενείς με υπερτασική νεφροσκλήρυνση. Τις πρώτες 6-8 εβδομάδες της ζωής τους τα ζώα του μοντέλου SHR αναπτύσσουν μια κατάσταση προ-υπέρτασης και στις επόμενες 12-14 εβδομάδες σταδιακά εμφανίζουν υπέρταση, με τα αρσενικά SHR ζώα να είναι περισσότερο επιρρεπή από τα θηλυκά, όπως συμβαίνει και στον άνθρωπο. Επομένως, το μοντέλο SHR είναι το πλέον κατάλληλο για τη μελέτη ανεύρεσης πιθανών πρώιμων δεικτών υπερτασικής νεφροπάθειας. Όμως, τόσο στο πειραματικό μοντέλο όσο και στον άνθρωπο οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται και τα μακρομόρια που συμμετέχουν κατά την ανάπτυξη της υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης είναι ιδιαίτερα πολύπλοκα και εν πολλοίς άγνωστα.

Το μοντέλο SHR έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την υπέρταση, για την μελέτη των επιπλοκών που εμφανίζονται στα όργανα στόχους από την υπέρταση καθώς και για την δοκιμή πιθανών θεραπευτικών φαρμακολογικών παραγόντων [20]. Πρόσφατες μελέτες στο μοντέλο υποστηρίζουν πως η βλάβη στα αγγεία ευθύνεται για την ατροφία που παρατηρείται στα νεφρικά σωληνάκια και για την σπειραματοσκλήρυνση. Επιπλέον, έχειδειχθεί πως η βλάβη στα αγγεία προϋπάρχει της βλάβης που εμφανίζεται στα σπειράματα [30]. Ωστόσο, ο μηχανισμός εξέλιξης της αγγειακής βλάβης σε σπειραματική και σωληναριακή βλάβη παραμένει αδιευκρίνιστος. Κατά συνέπεια, είναι σημαντικό να μελετηθούν με μεγαλύτερη λεπτομέρεια και με τη χρήση σύγχρονων μεθόδων ολιστικής προσέγγισης όπως είναι η πρωτεομική ανάλυση, τα πρώτα στάδια ανάπτυξης της υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης στο μοντέλο SHR, προκειμένου να αποκαλυφθούν μακρομόρια με κρίσιμο ρόλο στη νεφρική βλάβη και να αποσαφηνιστούν οι υποκείμενοι μηχανισμοί. Τα ευρήματα αυτά μπορεί να αποτελέσουν τη βάση για την επέκταση της έρευνας και στην ανθρώπινη υπέρταση.

## 1.5 Πρωτεομική

---

Η καλύτερη προσέγγιση για την ανεύρεση πρωτεϊνών-δεικτών σε πολυπαραγοντικές παθολογικές καταστάσεις είναι η βιολογία συστημάτων και ειδικότερα η πρωτεομική ανάλυση (proteomics). Η πρωτεομική αποτελεί το ερευνητικό πεδίο το οποίο ασχολείται με την ανάλυση σε μεγάλη κλίμακα του πρωτεόματος, δηλαδή των πρωτεϊνών οι οποίες παράγονται από το γονιδίωμα ενός οργανισμού. Η πρωτεομική χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό περίπλοκων και εξειδικευμένων τεχνικών και προσεγγίσεων, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας καθώς και η βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων. Με τα παραπάνω επιτυγχάνεται διαχωρισμός, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών. Έτσι, μπορούν να ταυτοποιηθούν πρωτεΐνες που βρίσκονται σε υγρά του σώματος ή δείγματα ιστών, σε μεγάλη κλίμακα. Κάποιες από τις πρωτεΐνες που αναγνωρίζονται δύνανται να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την έγκαιρη πρόγνωση και διάγνωση των νεφρικών ή άλλων ασθενειών, καθώς και ως στόχοι θεραπευτικών προσεγγίσεων. Επομένως, η χρήση της πρωτεομικής και οι πληροφορίες που προέρχονται από αυτήν προσφέρουν τεράστιες δυνατότητες για την κατανόηση των ασθενειών και την ταυτοποίηση διαγνωστικών δεικτών και θεραπευτικών στόχων.

Οι πρωτεϊνικοί δείκτες, δηλαδή πρωτεΐνες οι οποίες αυξάνονται ή μειώνονται κατά την πορεία μιας ασθένειας και που ταυτοποιούνται με τις διαδικασίες της πρωτεομικής έχουν ένα ευρύτατο φάσμα εφαρμογών. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σκοπούς κλινικής διάγνωσης ή πρόγνωσης. Αρχικά, μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τους μοριακούς μηχανισμούς που έχουν ενεργοποιηθεί. Στη συνέχεια, οι δείκτες μπορεί επίσης να βοηθήσουν στο σχεδιασμό μίας βέλτιστης θεραπευτικής αγωγής για ομάδες ασθενών, καθώς επίσης και για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπευτικής τους αγωγής. Με τον τρόπο αυτό οι πρωτεϊνικοί δείκτες μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να επιταχύνουν τις κλινικές δοκιμές και να τις κάνουν πιο αποτελεσματικές. Εάν περαιτέρω βιοχημική έρευνα αποκαλύψει την σχέση των πρωτεϊνικών δεικτών με την παθολογία της ασθένειας, οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να χρησιμεύσουν ως μοριακοί στόχοι για θεραπευτική παρέμβαση.

Η πρωτεομική ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί για την εύρεση βιοδεικτών τόσο για την χρόνια όσο και για την οξεία νεφρική νόσο και έχει εφαρμοστεί σε δείγματα ιστού, ούρων αλλά και εξωσώματα των ούρων [31]. Ειδικότερα, η πρωτεομική ανάλυση κυρίως δειγμάτων ούρων έχει αποκαλύψει την παρουσία σε αυτά γνωστών πρωτεϊνών που

σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις στα νεφρά και προέρχονται από εκκρίσεις των νεφρικών επιθηλιακών κυττάρων [32]. Τέτοιες πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τις aquaporin-2, polycystin-1, podocin, non-muscle myosin II, angiotensin-converting enzyme, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>2Cl<sup>-</sup> cotransporter (NKCC2), thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter (NCC) και άλλες. Επιπλέον, πρωτεομικές μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί τόσο σε ανθρώπινα δείγματα όσο και σε ζωικά μοντέλα για τη μελέτη της διαφορικής έκφρασης πρωτεϊνών στη διαβητική νεφροπάθεια, την αλβουμινουρία, καθώς και άλλες παθήσεις του νεφρικού σπειράματος και των νεφρικών σωληναρίων, με σκοπό το διαγνωστικό διαχωρισμό του παθολογικού από το φυσιολογικό ιστό αλλά και τη βαθύτερη κατανόηση των μορίων και των μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεση των ασθενειών [33,34].

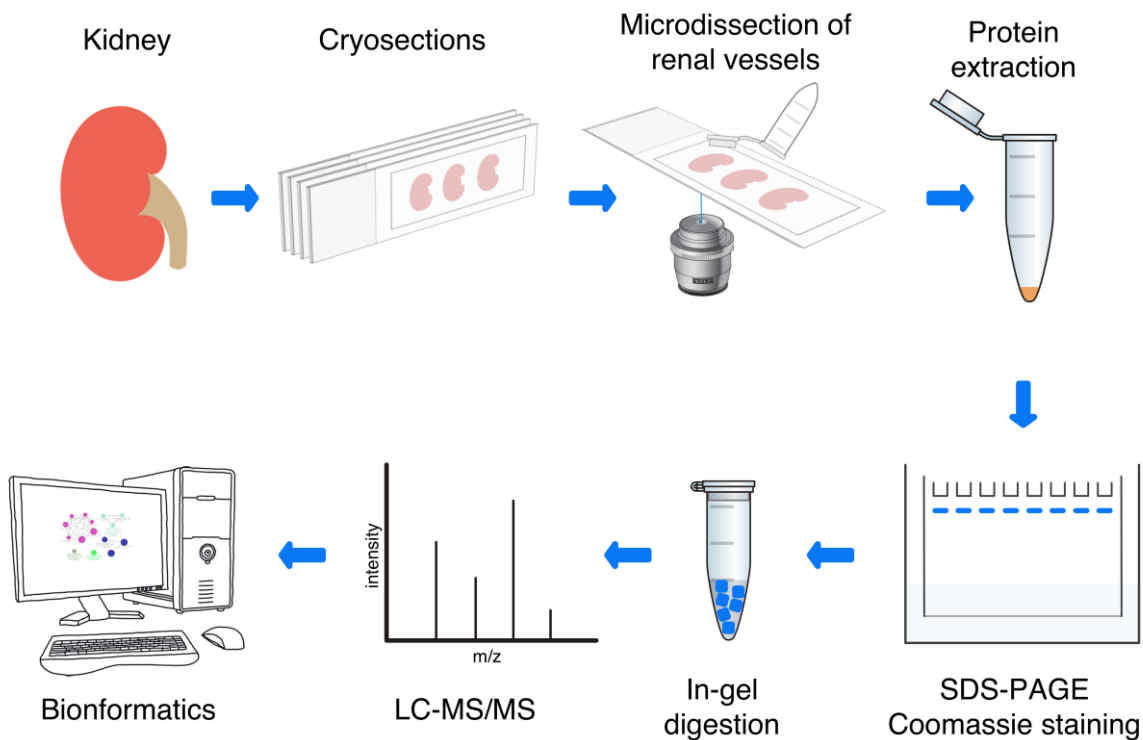
Στην παρούσα διατριβή η πρωτεομική ανάλυση εφαρμόστηκε στο υπερτασικό ζωικό μοντέλο SHR και σε αντίστοιχα νορμοτασικά ζώα με σκοπό την ταυτοποίηση πρωτεϊνών με κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη της υπέρτασης στα ζώα αυτά. Συγκεκριμένα εφαρμόσαμε τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις:

Η πρώτη προσέγγιση πρωτεομικής πραγματοποιήθηκε σε ολόκληρο το νεφρικό παρέγχυμα των υπερτασικών και νορμοτασικών ζώων εφαρμόζοντας την τεχνική της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης ακολουθούμενη από MALDI-MS. Ο αρχικός στόχος ήταν να ταυτοποιήσουμε πρωτεΐνες του νεφρού που η έκφρασή τους αλλάζει εξαιτίας της παρουσίας υψηλής αρτηριακής πίεσης στα ζώα αυτά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση ώστε να εντοπιστούν εκείνα τα βιολογικά μονοπάτια που απορρυθμίζονται από την ανάπτυξη της υπέρτασης. Τα αποτελέσματα αυτά παρατίθενται στην Ενότητα 3.3.1.

Η δεύτερη προσέγγιση πρωτεομικής πραγματοποιήθηκε επίσης σε ολόκληρο το νεφρικό παρέγχυμα των υπερτασικών και νορμοτασικών ζώων εφαρμόζοντας την τεχνική LC-MS/MS. Ο σκοπός ήταν να επαναλάβουμε την πρωτεομική και την βιοπληροφορική ανάλυση στα ίδια ζώα εφαρμόζοντας την τεχνική LC-MS/MS η οποία έχει μεγάλη διακριτική ικανότητα και κατά συνέπεια είναι πολύ πιο ευαίσθητη από την δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση. Τα αποτελέσματα αυτά παρατίθενται αναλυτικά στην Ενότητα 3.3.2.

Η τρίτη προσέγγιση πρωτεομικής πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά στα νεφρικά αγγεία. Γνωρίζοντας πως μια από τις σημαντικότερες επιπτώσεις της υπέρτασης είναι η βλάβη που προκαλεί στα αγγεία, απομονώσαμε με εξαιρετική ακρίβεια αγγεία από το νεφρικό παρέγχυμα SHR και WKY ζώων ηλικίας 20 εβδομάδων με την χρήση της τεχνικής Laser Capture Microdissection και πραγματοποιήσαμε πρωτεομική ανάλυση αποκλειστικά στα απομονωμένα αγγεία με την τεχνική GeLC-MS/MS. Στην Εικόνα 7

παρατίθεται η γραφική απεικόνιση της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε στην πρωτεομική ανάλυση των νεφρικών αγγείων. Τα αποτελέσματα της πρωτεομικής παρατίθενται αναλυτικά στην Ενότητα 3.3.3.



**Εικόνα 7:** Γραφική απεικόνιση της μεθοδολογίας που εφαρμόστηκε για την ανάλυση του πρωτεόματος των νεφρικών αγγείων υπερτασικών και νορμοτασικών ζώων με τις τεχνικές *Laser Capture microdissection* και *GeLC-MS/MS*.

Οι μελέτες που πραγματοποιήσαμε στο μοντέλο SHR με την βοήθεια της πρωτεομικής είχαν ως αποτέλεσμα μεγάλο όγκο δεδομένων. Ταυτοποιήθηκε μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών, ορισμένες από τις οποίες παρουσίαζαν διαφορετική έκφραση στα υπερτασικά ζώα σε σύγκριση με τα νορμοτασικά. Από την ανάλυση των συνολικών πρωτεϊνών επιλέχθηκαν δύο, η CLIC4 (chloride intracellular protein 4) και η SGLT2 (sodium/glucose co-transporter 2), για περαιτέρω μελέτη και επιβεβαίωση των ευρημάτων της πρωτεομικής ανάλυσης. Ορισμένα στοιχεία για τις πρωτεΐνες αυτές αναφέρονται στις δύο επόμενες ενότητες.

## 1.6 Chloride Intracellular Channel protein 4, CLIC4

---

Τα κανάλια χλωρίου είναι μια ετερογενής ομάδα πρωτεϊνών που ρυθμίζουν θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες όπως η σταθεροποίηση του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης, η διεπιθηλιακή μεταφορά (transepithelial transport), η διατήρηση του ενδοκυτταρικού pH και η ρύθμιση του όγκου των κυττάρων. Η οικογένεια των CLICs πρωτεϊνών αποτελείται από 6 μέλη (CLIC1-6) και είναι σημαντικά συντηρημένη στα Σπονδυλωτά. Τα μόρια αυτά υπάρχουν σε δύο μορφές μέσα στο κύτταρο, τόσο σε διαλυτή μορφή όσο και σε μεμβρανική και για το λόγο αυτό διαφέρουν από τα συνηθισμένα μόρια που αποτελούν διαύλους ιόντων [35].

Η πρωτεΐνη CLIC4 (Chloride Intracellular Channel protein) αποτελεί ένα κανάλι χλωρίου και είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών p64. Η CLIC4 είναι γνωστό πως αλληλοεπιδρά με διάφορες κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες (dynamin I,  $\alpha$ -tubulin,  $\beta$ -actin, creatine kinase , δύο ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών) κοντά ή πάνω στην πλασματική μεμβράνη [36]. Στο νεφρό η πρωτεΐνη CLIC4 εκφράζεται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου όπου και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην μεταφορά ουσιών στα κύτταρα αυτά. Ειδικότερα, η CLIC4 ρυθμίζει την εξωκύτωση στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών σωληναριακών κυττάρων μέσω της διαμεσολαβούμενης από ρετρομερή και ακτίνη ενδοκυτταρικής διακίνησης. Επιπλέον, η CLIC4 έχει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό του κεντρικού αυλού των σωληναρίων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη [37].

## 1.7 Sodium/Glucose Co-transporter 2, SGLT2

---

Οι νεφροί απελευθερώνουν γλυκόζη στην κυκλοφορία με δύο διαδικασίες: μέσω της διάσπασης του γλυκογόνου σε ελεύθερη γλυκόζη (γλυκογονόλυση) και μέσω γλυκονεογένεσης όπου δημιουργούν ελεύθερη γλυκόζη από γαλακτικό, πυροσταφυλικό οξύ και αμινοξέα. Όμως, οι νεφροί έχουν την ικανότητα να φιλτράρουν και να απορροφούν γλυκόζη από το πειραματικό διήθημα πίσω στην κυκλοφορία του αίματος. Περίπου 180 γραμμάρια γλυκόζης φιλτράρονται καθημερινά από τα σπειράματα, τα περισσότερα εκ των οποίων απορροφούνται από το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, με την βοήθεια μορίων μεταφορέων SGLTs και παθητικούς μεταφορείς γλυκόζης GLUTs.

Το σημαντικότερο από αυτά τα μόρια είναι ο συμμεταφορέας γλυκόζης και ιόντων  $\text{Na}^+$  SGLT2 (Sodium glucose co-transporter 2). Ο συμμεταφορέας SGLT2 αποτελεί τον κύριο μεταφορέα, που ευθύνεται για την επαναρρόφηση της γλυκόζης από το πειραματικό διήθημα στη συστηματική κυκλοφορία και εκφράζεται εκλεκτικά στους νεφρούς, χωρίς να ανιχνεύεται σε περισσότερους από 70 άλλους ιστούς συμπεριλαμβανομένων του ήπατος, των σκελετικών μυών, του λιπώδους ιστού, του μαστού, της ουροδόχου κύστης και του εγκεφάλου. Ο SGLT2 χαρακτηρίζεται ως πρωτεΐνη υψηλής χωρητικότητας και χαμηλής συνάφειας και ευθύνεται για την επαναρρόφηση περίπου 90-95% (160-180 g/d) της συνολικής γλυκόζης από το πειραματικό διήθημα στο τμήμα S1 του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου. Το υπόλοιπο της γλυκόζης επαναρροφάται από τον συμμεταφορέα SGLT1 στο S3 τμήμα του εγγύς σωληναρίου.

Τα τελευταία χρόνια ο SGLT2 αποτελεί τον κυριότερο στόχο μιας νέας θεραπευτικής κατηγορίας φαρμάκων για το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 που δρουν αναστέλλοντας την νεφρική επαναρρόφηση της γλυκόζης με μηχανισμό ανεξάρτητο από την ινσουλίνη [38]. Η δράση των φαρμάκων αυτών έγκειται στην αναστολή του SGLT2 ώστε να προάγουν την επαναρρόφηση της μεγαλύτερης ποσότητας διηθούμενης γλυκόζης από τα εγγύς νεφρικά σωληνάκια, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η αποβολή γλυκόζης στα ούρα (γλυκοζουρία) και να μειώνεται η υπεργλυκαιμία ανεξάρτητα από την λειτουργία της ινσουλίνης. Με τον αποκλεισμό των συμμεταφορέων SGLT2, οι συμμεταφορείς SGLT1 που έχουν μικρότερη μεταφορική δυνατότητα αν και έχουν μεγαλύτερη συνάφεια με τη γλυκόζη από τους SGLT2 επωμίζονται το μεγαλύτερο φόρτο στην επαναρρόφηση της γλυκόζης ώστε να αποτρέπεται το ενδεχόμενο ανεπιθύμητης υπογλυκαιμίας.

Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν τα μακροπρόθεσμα καρδιαγγειακά και νεφρικά οφέλη των αναστολέων του SGLT2 καθώς και ευνοϊκές επιδράσεις στην αρτηριακή πίεση,

τα επίπεδα ουρικού οξέος, την ενδοεφρική αιμοδυναμική και την αλβουμινουρία [39,40]. Επιπλέον, η αναστολή του SGLT2 έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της πρωτεϊνουρίας και της φλεγμονής στο νεφρό [41,42]. Τα ευρήματα αυτά συνδέονται με σημαντική μείωση της συστολικής αρτηριακής πίεσης και συμβαίνουν παρά την διέγερση του ενδοεφρικού συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης [43].

## 1.8 Σκοπός της διατριβής

---

Παρόλο που η υπερτασική νεφροσκλήρυνση αποτελεί την δεύτερη αιτία τελικής νεφρικής νόσου, οι μηχανισμοί που οδηγούν στην εμφάνισή της παραμένουν άγνωστοι. Επιπλέον, δεν έχουν βρεθεί αξιόπιστοι πρώιμοι δείκτες για την έγκαιρη διάγνωση και την εκτίμηση της νεφρικής βλάβης που προκαλεί η υπέρταση. Επειδή οποιαδήποτε νεφρική βλάβη μπορεί να εξελιχθεί αθόρυβα σε ανεπάρκεια νεφρών, είναι μείζονος σημασίας να βρεθούν πρώιμοι δείκτες είτε στο αίμα είτε στα ούρα, που θα επιτρέπουν στους νεφρολόγους την έγκαιρη διάγνωση της νεφρικής νόσου και τον σχεδιασμό θεραπείας πριν εκδηλωθεί βλάβη στο νεφρικό παρέγχυμα. Στόχος της διατριβής είναι να συμβάλλει προς αυτή την κατεύθυνση.

Συγκεκριμένα, οι κύριοι στόχοι είναι οι εξής:

- 1) η διεξοδική μελέτη του υπερτασικού μοντέλου SHR, σε τρία διαφορετικά στάδια ανάπτυξης (6, 13 και 20 εβδομάδων), χρησιμοποιώντας προηγμένες τεχνικές πρωτεομικής ανάλυσης, προκειμένου να ανιχνευθούν πρωτεΐνες-δείκτες στα αρχικά στάδια ανάπτυξης της υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης.
- 2) η ταυτοποίηση των δεικτών και η επαλήθευση των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής ανάλυσης, και ο εντοπισμός αλλαγών στο νεφρικό παρέγχυμα τόσο σε μοριακό όσο και σε βιοχημικό επίπεδο

Η σημασία της παρούσας μελέτης έγκειται στο εξής: η ανεύρεση συγκεκριμένων δεικτών μεταβολών σε νεφρικό παρέγχυμα σε πολύ αρχικά στάδια ανάπτυξης υπέρτασης, μπορεί να οδηγήσει στο εγγύς μέλλον σε ανάδειξη κάποιων από αυτούς σε δείκτες αρχόμενης νεφρικής βλάβης σε δείγματα ούρων. Ο στόχος αυτός είναι εξαιρετικής σημασίας, γιατί θα μπορεί εύκολα να γίνεται screening μεγάλου μέρους του πληθυσμού και να εντοπίζονται σε πολύ αρχικά στάδια άτομα με αρχόμενες ανατομικές βλάβες, πολύ πριν οδηγήσουν σε λειτουργική έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας.



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### 2.1 Πειραματόζωα

---

Αρσενικοί επίμυες ηλικίας 4 και 11 εβδομάδων, υπερτασικοί (SHR) και νορμοτασικοί (WKY), παραγγέλθηκαν από το Charles River Laboratories στην Γερμανία. Τα ζώα φιλοξενήθηκαν στις εγκαταστάσεις πειραματόζωων του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος». Όταν οι επίμυες έφτασαν στην ηλικία των 6, 13 και 20 εβδομάδων, 8 υπερτασικά και 8 νορμοτασικά ζώα από κάθε ηλικιακή ομάδα ζυγίστηκαν και τους μετρήθηκε η μέση αρτηριακή πίεση. Αρχικά, τα ζώα ακινητοποιήθηκαν και στη συνέχεια μετρήθηκε η πίεσή τους από την ουρά χρησιμοποιώντας την τεχνική Computerized rat tail-cuff technique (Kent Scientific, Co., Torrington, CT, USA). Μετά τη μέτρηση της πίεσης τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με αιθέρα και θυσιάστηκαν. Οι νεφροί τους απομονώθηκαν, ξεπλύθηκαν με PBS 1x και στην συνέχεια τεμαχίστηκαν σε 4 κομμάτια. Το κάθε κομμάτι χρησιμοποιήθηκε για καθεμία από τις εξής αναλύσεις:

- απομόνωση πρωτεϊνών για πρωτεομική ανάλυση και Western blot,
- απομόνωση RNA για Real Time PCR,
- εγκλεισμό σε παραφίνη και λήψη τομών για ανοσοϊστοχημεία ή ανοσοφθορισμό,
- λήψη κρυοτομών για απομόνωση νεφρικών αρτηριδίων με Laser Capture Microdissection

Όλες οι διαδικασίες και οι χειρισμοί των ζώων έγιναν σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα ώστε τα ζώα να μην υποφέρουν καθ'όλη την διάρκεια των πειραμάτων.

## 2.2 Πρωτεομική Ανάλυση

---

### 2.2.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών

---

Η εκχύλιση πρωτεϊνών από νεφρικό ιστό πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη συλλογή δειγμάτων για πρωτεομική ανάλυση και για Western blotting. Κομμάτια νεφρικού ιστού (50 - 80mg) από SHR και WKY ζώα από όλες τις ηλικιακές ομάδες αποθηκευμένα στους -80 °C, μεταφέρθηκαν σε 2ml tubes όπου στο καθένα προστέθηκαν 200 μl FASP lysis buffer (0,1M Tris-HCl pH 7,6, 4% SDS, 0,1 DTE). Στη συνέχεια ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση του Bullet blender Storm 24 για 5min στην ένδειξη maximum και για 3 min στην ένδειξη low. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 13.000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο που περιείχε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε νέα tubes και φυλάχθηκε για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford. Μετά τη μέτρηση σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 7 μl inhibitors και φυλάχθηκαν στους -20 °C.

### 2.2.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

---

Η συγκέντρωση πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 απορροφά στα 595 nm όταν συνδέεται με πρωτεΐνες. Η μέθοδος απαιτεί την κατασκευή πρότυπης καμπύλης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αγνώστου δείγματος πρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα BSA σε dH<sub>2</sub>O συγκέντρωσης 1 μg/μl. Διαφορετικές ποσότητες του διαλύματος (0, 5, 10, 20, 25 μl) αραιώθηκαν με dH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 100 μl, στη συνέχεια προστέθηκαν σε 2 ml 1x διαλύματος χρωστικής BIORAD protein assay και η απορρόφησή τους μετρήθηκε στα 595 nm. Με βάση τις μετρήσεις κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη που αντιστοιχούσε τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων BSA σε συγκεκριμένες τιμές απορρόφησης.

Τα δείγματα των πρωτεϊνών άγνωστης συγκέντρωσης αραιώθηκαν 20 φορές και 10 μl από κάθε αραιωμένο δείγμα προστέθηκε σε 1ml αντιδραστήριο Bradford. Η συγκέντρωση των δειγμάτων προσδιορίστηκε μετά από 5 min σε φωτόμετρο SmartSpec Plus (BioRad).

### 2.2.3 Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση 2DE

Η ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων 2DE είναι μια κλασική τεχνική διαχωρισμού για ακέραιες πρωτεΐνες με υψηλή ανάλυση. Συνδυάζει την Ισοηλεκτρική Εστίαση (IEF, Isoelectric Focusing) και τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με SDS-PAGE και εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1975. Κάθε πρωτεΐνη έχει ένα χαρακτηριστικό σημείο της κλίμακας του pH όπου δεν έχει καθαρό φορτίο. Το σημείο αυτό ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο (isoelectric point) και η τιμή του εξαρτάται από την περιεκτικότητα της κάθε πρωτεΐνης σε αριθμό και είδος αμινοξέων. Στο ισοηλεκτρικό σημείο οι πρωτεΐνες δεν κινούνται ούτε προς την άνοδο ούτε προς την κάθοδο κατά την ηλεκτροφόρηση.

Η ισοηλεκτρική εστίαση είναι μια ηλεκτροφορητική μέθοδος διαχωρισμού που διαχωρίζει τα αμφοτερικά μόρια όπως πρωτεΐνες και πεπτίδια ανάλογα με τις τιμές pKa των περιοχών που δέχονται πρωτόνια μέσα σε ένα μόριο. Στα πεπτίδια και τις πρωτεΐνες, αυτές οι περιοχές βρίσκονται στις ελεύθερες αμίνες και στα καρβοξυλικά οξέα που βρίσκονται στα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα καθώς και στις πλευρικές αλυσίδες της αργινίνης, λυσίνης, ιστιδίνης, ασπαρτικού οξέος και καταλοΐπων γλουταμινικού οξέος. Το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) είναι μια συγκεκριμένη φυσικοχημική παράμετρος ενός αμφοτερικού μορίου όπου ένα μόριο έχει «καθαρό» ουδέτερο φορτίο. Οι σύγχρονες τεχνικές ισοηλεκτρικής εστίασης για δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούν ένα λεπτό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης το οποίο περιέχει αμφολύτες, δηλαδή Ακινητοποιημένες Διαβαθμίσεις pH (Immobilized pH Gradient, IPG). Τα πηκτώματα έχουν χαμηλή συγκέντρωση ακρυλαμίδης (4-5%) έτσι ώστε να μη περιορίζεται η ανάλυση των πρωτεϊνών υψηλού μοριακού βάρους. Μετά την εισαγωγή των πρωτεϊνών στο παραπάνω μέσο, εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο και οι πρωτεΐνες που τοποθετούνται στην χαμηλότερη (πιο όξινη) διαβάθμιση του pH σε σχέση με το pI τους θα φορτιστούν θετικά και θα μεταναστεύσουν προς την κάθοδο του ηλεκτρικού πεδίου. Αντίθετα οι πρωτεΐνες που τοποθετούνται στην υψηλότερη (πιο βασική) διαβάθμιση του pH σε σχέση με το pI τους θα φορτιστούν αρνητικά και θα μεταναστεύσουν προς την άνοδο του ηλεκτρικού πεδίου. Οι πρωτεΐνες θα σταματήσουν να κινούνται όταν φτάσουν στο ισοηλεκτρικό τους σημείο όπου το pH τους ισούται με το pI, εφόσον το pI είναι το pH στο οποίο η πρωτεΐνη έχει ουδέτερο φορτίο. Επομένως το ηλεκτρικό φορτίο δεν έχει επίδραση στο σημείο εκείνο όπου η διαβάθμιση pH ισούται με το pI.

Με την τεχνολογία των IPG, η διαβάθμιση pH σχηματίζεται από όξινες και αλκαλικές ομάδες που μεσολαβούν και πολυμερίζονται με το πλέγμα πολυακρυλαμίδης. Επιπλέον προστίθεται και γλυκερόλη για την σταθεροποίηση της διαβάθμισης του pH.

Μετά τον σχηματισμό του πηκτώματος, καταλύτες πολυμερισμού και μόρια που δεν αντιδρούν απομακρύνονται από το πλέγμα με αποσταγμένο νερό, έτσι ώστε να παραχθεί η πολύ χαμηλή αγωγιμότητα που είναι απαραίτητη για την ισοηλεκτρική εστίαση. Επιπλέον ποσότητα αμφολυτών προστίθεται στο δείγμα και χρησιμοποιείται με σκοπό της βελτίωσης της αγωγιμότητας και της διαλυτότητας των πρωτεϊνών. Οι προπαρασκευασμένες ταινίες IPG είναι εμπορικά διαθέσιμες. Συγκεκριμένα υπάρχουν διαβαθμίσεις pH σε διάφορα εύρη (π.χ. pH 3–11), ενδιάμεσα εύρη (π.χ. pH 4–7, pH 7–11) και πιο περιορισμένα εύρη (π.χ. pH 4–5, pH 5.5–6.5).

Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού, η ταινία είτε εξισορροπείται ως προς τη σύσταση των διαλυμάτων της 2ης διάστασης (pH, ρυθμιστικό, SDS) είτε μπορεί να φυλαχθεί στους -20 °C. Η εξισορρόπηση γίνεται στα εξής 2 στάδια: 1) Πρώτα γίνεται η αναγωγή και 2) έπειτα ακολουθεί η αλκυλίωση των σουλφυδρυλομάδων των πρωτεϊνών. Η αλκυλίωση θεωρείται βασικό στάδιο της πρωτεομικής, καθώς χάρη σε αυτή αποφεύγεται ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των αλυσίδων των αμινοξέων και διευκολύνεται η κατάτμηση των πρωτεϊνών που προηγείται της φασματομετρίας μάζας.

Η εκτέλεση της τεχνικής ξεκινά με την ενυδάτωση της ξηρής ταινίας, η οποία γίνεται επί δωδεκάωρο, και συνεχίζεται με την τοποθέτηση του δείγματος και την εκτέλεση του διαχωρισμού. Εναλλακτικά, το δείγμα μπορεί να εισαχθεί στην ταινία κατά την ενυδάτωσή της στη διάρκεια της νύχτας. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται καλύτερη εισδοχή των πρωτεϊνών ιδίως αυτών μεγαλύτερου μεγέθους. Η διαδικασία της εστίασης γίνεται με την εφαρμογή ενός προγράμματος αυξομειούμενης τάσης που διαρκεί από 1 μέχρι 3 μέρες περίπου. Όταν η ένταση του ρεύματος καταστεί σχεδόν μηδενική, τότε κάθε κίνηση εντός του πηκτώματος έχει σταματήσει που σημαίνει ότι τα βιομόρια έχουν εστίασει. Οι αναλύσεις IEF μετρώνται σε βολτώρες (Vh) (μία ώρα εστίασης σε τάση 1000 V ισοδυναμεί με 1000 Vh). Η επί μακρόν εστίαση των πρωτεϊνών ονομάζεται υπερεστίαση και μπορεί να οδηγήσει σε οξείδωση διαφόρων πλευρικών ομάδων αμινοξέων αλλοιώνοντας το pI τους.

Η τεχνική διαχωρισμού των πρωτεϊνών με SDS-PAGE (Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) αποτελεί το δεύτερο στάδιο της ηλεκτροφόρησης 2 διαστάσεων SDS-PAGE. Βασίζεται στην διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών με το απορυπαντικό Δωδέκυλο Θεϊκό Νάτριο (SDS, Sodium Dodecyl Sulfate) και στον μετέπειτα διαχωρισμό τους προς την ίδια κατεύθυνση με βάση το μοριακό τους βάρος. Αποτελεί μια κατάλληλη επιλογή για την ανάλυση ακέραιων πρωτεϊνών από όταν

περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Laemmli το 1970 [44]. Οι πρωτεΐνες αναλύονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου που δημιουργείται από αλυσίδες πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου συνδεδεμένες μεταξύ τους με τη βοήθεια του N,N'-methylene bisacrylamide. Το Υπερθειικό Αμμώνιο (APS, Ammonium Persulfate) παρέχει ελεύθερες ρίζες για τον πολυμερισμό των πηκτωμάτων μετά την προσθήκη του TEMED (Tetramethylethylenediamine). Έτσι δημιουργούνται πόροι διαφορετικών μεγεθών στο πήκτωμα οι οποίοι προσφέρουν και διαφορετικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών, ανάλογα με την συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου. Τα πρωτεϊνικά μόρια μικρότερου μεγέθους κινούνται πιο γρήγορα σε σχέση με τα μεγαλύτερα.

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών βασίζεται στην εξής αρχή: Κατά την προσθήκη του SDS οι πρωτεΐνες σχηματίζουν ανιονικά μικκύλια όπου υπάρχει συνεχές ένα αρνητικό φορτίο ανά μονάδα μάζας. Τα πολυπεπτιδία ξεδιπλώνονται καθώς οι δευτεροταγείς και οι τεταρτοταγείς δομές διακόπτονται. Η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με την καταστροφή των δισουλφυδικών δεσμών ανάμεσα στις κυστεΐνες μέσω ενός αναγωγικού παράγοντα συνήθως μερκαπτοαιθανόλης, διθειοθρεϊτόλης ή διθειοερυθριτόλης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα μικύλια SDS-πρωτεϊνών μεταναστεύουν προς την άνοδο (+) καθώς οι ηλεκτροφορητικές τους ιδιότητες εξαρτώνται από το μοριακό τους βάρος αλλά μπορούν να επηρεαστούν και από την υδροφοβικότητα των πρωτεϊνών. Με τη βοήθεια πρωτεϊνών καθορισμένων μοριακών βαρών (ladder) οι οποίες μεταναστεύουν παράλληλα με τις πρωτεΐνες που αναλύονται, τα μοριακά βάρη των πολυπεπτιδίων μπορούν να καθοριστούν. Στην εικόνα 14 παρουσιάζονται τα βασικά στάδια της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης.

Ο συνδυασμός της ηλεκτροφόρησης 2 διαστάσεων με την φασματομετρία μάζας αποτελεί τον βασικό πυρήνα της μεθοδολογίας ανάλυσης πρωτεϊνών στην πρωτεομική. Η μεγάλη διαχωριστική ικανότητα των 2D-PAGE gels σε συνδυασμό με την φασματομετρία μάζας οδηγεί στην ταυτοποίηση πρωτεϊνικών συστατικών σε πολύπλοκα δείγματα.

#### **2.2.4 Ανάλυση εικόνας δισδιάστατων πηκτωμάτων (Image Analysis)**

---

Μετά τη χρώση με Coomassie Colloidal Blue τα πηκτώματα είχαν πλέον εμφανείς τις πρωτεϊνικές κηλίδες. Η ανάλυση των δισδιάστατων πηκτωμάτων σε υπολογιστή που διαθέτει κατάλληλο λογισμικό είναι απαραίτητη διαδικασία μετά τη δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση. Η ανάλυση των ψηφιακών εικόνων επιτρέπει την ανίχνευση πρωτεϊνικών κηλίδων, την ποσοτικοποίησή τους, τη σύγκριση πηκτωμάτων και τη στατιστική

επεξεργασία. Τα πηκτώματα, μετά τη σάρωση τοποθετήθηκαν σε ειδικές νάιλον σακούλες μαζί με μία μικρή ποσότητα απιοντισμένου νερού και αποθηκεύτηκαν στους 4°C.

Τα πηκτώματα σαρώθηκαν χρησιμοποιώντας το μηχάνημα GS-800 imaging densitometer (Bio Rad) και οι εικόνες αποθηκεύτηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή για περαιτέρω επεξεργασία. Η ανάλυση των εικόνων με σκοπό την ανίχνευση πρωτεϊνικών κηλίδων, την ποσοτικοποίησή τους καθώς και τη σύγκριση πηκτωμάτων έγινε με το λογισμικό PD Quest 8 (Biorad). Το συγκεκριμένο λογισμικό επιτρέπει τον εντοπισμό των διαφορετικά εκφραζόμενων κηλίδων [45]. Μόλις εντοπίστηκαν οι διαφορετικά εκφραζόμενες πρωτεϊνικές κηλίδες ακολούθησε η εξαγωγή τους από το πηκτώμα και η αναγνώριση των πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας όπως αναφέρεται παρακάτω.

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών κηλίδων έγινε μέσω του ειδικού λογισμικού ανάλυσης εικόνας Biorad. Αφού επιλέχθηκε το αντικειμενικά καλύτερο πηκτώμα, το οποίο επεξεργάστηκε με έναν αλγόριθμο (Gaussian model) ακολούθησε η επιλογή των εξής παραμέτρων: 1) Απαλοιφή θορύβου (background noise subtraction), ψευδώς θετικών κηλίδων, οριζόντιων/κάθετων γραμμών (streaking), που μπορεί να προήλθαν από άλατα στο δείγμα. 2) Ευθυγράμμιση των πηκτωμάτων θέτοντας κηλίδες-ορόσημα σε κάθε πηκτώμα. 3) Οι κηλίδες ανιχνεύτηκαν, έγινε η αντιστοίχισή τους (matching) σε κάθε πηκτώμα και οι εικόνες των πηκτωμάτων κανονικοποιήθηκαν (normalization) με βάση τη συνολική πυκνότητα σε όλο το πηκτώμα (total density in gel). Αφού εκτελέστηκαν όλα τα παραπάνω στάδια, το λογισμικό παρείχε τον μέσο όρο της έντασης της εκάστοτε πρωτεϊνικής κηλίδας εκφρασμένο σε ppm.

### **2.2.5 Φασματομετρία μάζας**

---

Οι πρωτεομικές μέθοδοι βασίζονται κυρίως στην μεθοδολογία της φασματομετρίας μάζας η οποία επιτρέπει την αναγνώριση των πρωτεϊνών. Η παραπάνω μεθοδολογία εφαρμόζεται σε πολλές περιπτώσεις όπως η δημιουργία του προφίλ των πρωτεϊνών, η ανίχνευση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών και η ανίχνευση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται από μια πηγή ιοντισμού, τον αναλυτή μάζας ο οποίος μετράει την αναλογία μάζα προς φορτίο ( $m/z$ ) των ιοντισμένων αναλυτών και έναν ανιχνευτή που καταγράφει τον αριθμό των ιόντων για κάθε τιμή  $m/z$  [46,47]. Τα διαχωριζόμενα ιόντα ανιχνεύονται με τη μορφή ηλεκτρικού/ψηφιακού σήματος. Ο αναλυτής και ο ανιχνευτής του φασματογράφου,

συνήθως και η πηγή ιοντισμού βρίσκονται υπό συνθήκες υψηλού κενού για την αποφυγή της σύγκρουσης των αέριων ιόντων – αναλυτών με μόρια του αέρα [48].

## 2.2.6 LC-MS/MS

Τα πειράματα LC-MS/MS πραγματοποιήθηκαν στο σύστημα υγρής χρωματογραφίας Dionex Ultimate 3000 UHPLC το οποίο ήταν συζευγμένο με το υψηλής ανάλυσης σύστημα νανο-ηλεκτροψεκασμού σε συνδυασμό με παγίδα ιόντων (nano-ESI Orbitrap-Elite mass spectrometer, Thermo Scientific). Κάθε δείγμα ανασυστάθηκε σε 10  $\mu\text{L}$  κινητής φάσης Α (0,1 ο/ο% Μυρμηκικό Οξύ) και 5  $\mu\text{L}$  δείγματος εισήχθη στην χρωματογραφική προστήλη (Acclaim PepMap 100, 100  $\mu\text{m} \times 2 \text{ cm}$  C18, 5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ ) με ροή 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Ο διαχωρισμός των πεπτιδίων έγινε σε χρωματογραφική στήλη (Acclaim PepMap RSLC, 75  $\mu\text{m} \times 50 \text{ cm}$ , nanoViper, C18, 2  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ ) η οποία ήταν συνδεδεμένη με πηγή νανο-ηλεκτροψεκασμού μέσω υάλινης βελόνας επικαλυμμένης με μέταλλο (PicoTip). Τα πεπτίδια διαχωρίστηκαν με σταδιακή έκλυση. Η κινητή φάση (Α) αποτελούταν από 0,1 % Μυρμηκικό Οξύ και η κινητή φάση (Β) αποτελούταν από Ακετονιτρίλιο και 0,1% Μυρμηκικό Οξύ. Τα πεπτίδια εκλούστηκαν και διαχωρίστηκαν με διαβάθμιση συγκέντρωσης για 240 λεπτά από 2% (Β) σε 33% (Β). Ο ρυθμός ροής ήταν 300  $\text{nL}/\text{min}$  και η θερμοκρασία της στήλης τέθηκε στους 35°C. Η μετάβαση των διαχωρισμένων πεπτιδίων στην αέρια φάση έγινε με ηλεκτροψεκασμό θετικών ιόντων υπό τάση 2,5 kV. Σε κάθε αναζήτηση φάσματος MS, τα 10 πιο άφθονα πολλαπλά φορτισμένα πρόδρομα ιόντα με αναλογίες m/z από 300 ως 2200 και όριο έντασης 500 μετρήσεις (counts) επελέχθησαν με μετασχηματισμό Φουριέ (FT) διακριτικότητας 60.000 και υπέστην θραυσματοποίηση HCD (Higher-Energy Collisional Dissociation). Τα φάσματα μάζας συλλέχθηκαν με διακριτικότητα FT 15.000. Η κανονικοποιημένη ενέργεια θραυσματοποίησης ήταν 33 και τα επιλεγμένα πρόδρομα ιόντα αποκλείστηκαν για περαιτέρω απομόνωση και ενεργοποίηση για 45 δευτερόλεπτα με 5 ppm όριο σφάλματος μάζας.

Τα δεδομένα συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Xcalibur software (Thermo Electron Corp.) και η ανάλυση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Sequest στο λογισμικό Proteome Discoverer 1.4 (Thermo) και την ανθρώπινη βάση δεδομένων της Uniprot. Η αναζήτηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την καρβαμιδομεθυλίωση των κυστεϊνών ως στατική και την οξειδωση της μεθειονίνης ως δυναμική τροποποίηση. Τα όρια σφάλματος που

επιτράπηκαν ήταν 10 ppm για το πρόδρομο πεπτίδιο και 0,05 Da για τα παραγόμενα θραύσματα. Τα αποτελέσματα του Sequest εκτιμήθηκαν για τον αποκλεισμό των ψευδώς θετικών αναγνωρίσεων.

### **2.2.7 Ποσοτικοποίηση και στατιστική ανάλυση των LC-MS/MS αποτελεσμάτων**

Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε στο επίπεδο των πεπτιδίων όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως [49]. Συγκεκριμένα, εφόσον κάθε πεπτίδιο μπορεί να συσχετιστεί με 2 (ή περισσότερες) διαφορετικές αλληλουχίες, συλλέχθηκαν δεδομένα για τις κυριότερες πέντε κατηγοριοποιημένες αλληλουχίες. Οι παραπάνω αλληλουχίες εξισορροπήθηκαν έτσι ώστε η πιο πιθανή αλληλουχία ανά πεπτίδιο να ανατίθεται, βελτιώνοντας την συνοχή των δεδομένων. Χρησιμοποιήθηκε ένα λογισμικό που αναπτύχθηκε από συνεργάτες (όπως περιγράφεται παρακάτω), για την επίτευξη του παραπάνω στόχου. Η λίστα των πεπτιδίων εξήχθη από το Proteome Discoverer και υπέστη την περαιτέρω επεξεργασία: Σε κάθε φάσμα, η αντίστοιχη αλληλουχία καθορίστηκε βάση του σχετικού αριθμού αναγνωρίσεων της αλληλουχίας σε κάθε δείγμα. Η σχετική ποσοτική ανάλυση πραγματοποιήθηκε βασιζόμενη στις τιμές των πεπτιδίων. Οι αλληλουχίες που αποκτήθηκαν για όλα τα βιολογικά αντίγραφα ενοποιήθηκαν. Τα πεπτίδια αντιστοιχίστηκαν στις αντίστοιχες πρωτεΐνες. Τα πεπτίδια που αντιστοιχούσαν σε πολλαπλές πρωτεΐνες αντιστοιχίστηκαν στην πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε με τον υψηλότερο βαθμό πεπτιδίων (σύμφωνα με τον κανόνα «Occam's Razor») [50]. Εξαιτίας μίας δυσλειτουργίας στο λογισμικό «Proteome Discoverer», σε ένα περιορισμένο αριθμό αναγνωρισμένων πεπτιδίων η τιμή της έντασής τους δεν ανακτήθηκε. Σε τέτοιες περιπτώσεις, οι απολεσθείσες τιμές αντικαταστάθηκαν από τον μέσο όρο σε κάθε ομάδα. Μόνο οι πρωτεΐνες που ήταν παρούσες στο 60% των δειγμάτων σε μία ομάδα (3 από τα 4 βιολογικά αντίγραφα) αναλύθηκαν περαιτέρω με ποσοτικοποίηση και στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney). Ο παραπάνω τρόπος πολλές φορές συντελεί στην μη αναγνώριση πεπτιδίων στην μία κατηγορία (τα 3 από τα 4 βιολογικά αντίγραφα μπορεί να προέρχονται από την άλλη κατηγορία αποκλειστικά). Ως αποτέλεσμα δεν υπολογίζεται η τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD) στην ανάλυση LC-MS/MS. Οι πρωτεϊνικές αλλαγές με λόγο έκφρασης  $> 2$  και  $< 0.5$  καθώς και ταυτόχρονη στατιστική σημαντικότητα ( $p < 0,05$ ) ήταν οι διαφορικά εκφραζόμενες και αυτές που συμπεριλήφθηκαν στην περαιτέρω ανάλυση.



## 2.2.8 GeLC-MS/MS

---

Η τεχνική GELC-MS/MS χρησιμοποιείται ευρέως γιατί συνδυάζει 1) την απομόνωση των πρωτεϊνών από πήκτωμα (SDS-PAGE) και 2) την ανάλυση με LC-MS/MS η οποία είναι μια πάρα πολύ ευαίσθητη τεχνική όσον αφορά την αναγνώριση των πρωτεϊνών καθώς μπορούν να αναλυθούν ακόμη και λίγα  $\mu\text{g}$  (10-20) με μεγάλη ευαισθησία.

Τα δείγματα των πρωτεϊνών από νεφρικό ιστό διαλυτοποιήθηκαν σε ισοηλεκτρικό διάλυμα εστίασης (Isoelectric Focusing, IEF) [7M ουρία (Applichem), 2M θειουρία (Fluka), 4% CHAPS (Applichem), 1% DTE (Sigma), 2% IPG buffer (Bio-Rad Laboratories)]. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης καθορίστηκε με τη μέθοδο Bradford (Biorad). Αναστολείς πρωτεασών (Roche) προστέθηκαν σε τελική συγκέντρωση 3,6%. Έξι  $\mu\text{g}$  δείγματος φορτώθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης SDS-PAGE (5% πήκτωμα επιστοιβαξής, 12% πήκτωμα διαχωρισμού). Η ηλεκτροφόρηση σταμάτησε όταν τα δείγματα μπήκαν στο πήκτωμα διαχωρισμού, έτσι ώστε το πρωτεϊνικό περιεχόμενο να συγκεντρωθεί σε μία ζώνη για κάθε δείγμα. Κάθε πήκτωμα μονιμοποιήθηκε με 30% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ για 30 λεπτά. Τα πήκτωμα πλύθηκαν 3 φορές για 10 λεπτά με νερό και η χρώση πραγματοποιήθηκε με Coomassie κατά τη διάρκεια της νύχτας. Τα πήκτωμα πλύθηκαν με νερό 3 φορές για 10 λεπτά και κάθε πρωτεϊνική ζώνη κόπηκε σε μικρά κομμάτια (1-2mm). Τα κομμάτια πήκτωματος αποχρωματίστηκαν με 40% ακετονιτρίλιο, 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (όξινο ανθρακικό αμμώνιο) μέχρι να γίνουν τελείως διαφανή. Η αναγωγή πραγματοποιήθηκε με 10mM διθειοερυθριτόλη (DTE) σε 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  για 20 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Η αλκυλίωση πραγματοποιήθηκε με 10mg/mL ιωδοακεταμίδιο σε 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  για 20 λεπτά, στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, ένα ξέπλυμα πραγματοποιήθηκε με 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθούμενο από ένα ξέπλυμα με διάλυμα αποχρωματισμού για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, τα δείγματα πλύθηκαν άλλη μια φορά με νερό για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά, τα κομμάτια πήκτωματος αποξηράνθηκαν με φυγοκέντρηση υπό κενό (SpeedVac). Κάθε δείγμα θρυψινοποιήθηκε προσθέτοντας 600ng θρυψίνης (αρχικό διάλυμα θρυψίνης: 10ng/ $\mu\text{L}$  σε 10mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8.5, Roche). Τα πεπτίδια απομονώθηκαν με την εξής διαδικασία: Πρώτον, τα πεπτίδια επώαστηκαν με 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο φυλάχθηκε σε καθαρό σωληνάριο. Έπειτα τα πεπτίδια επώαστηκαν με 10% Μυρμηκικό Οξύ, Ακετονιτρίλιο (1:1) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία

δωματίου. Το υπερκείμενο αναμείχθηκε με το προηγούμενο. Η επώαση με 10% Μυρμηκικό Οξύ, Ακετονιτρίλιο (1:1) επαναλήφθηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο αναμείχθηκε με το προηγούμενο. Τα πεπτίδια που εκχυλίστηκαν με τον παραπάνω τρόπο (600  $\mu$ L) καθαρίστηκαν με φίλτρα PVDF (Merck Millipore) και έπειτα αποξηράνθηκαν υπό κενό με SpeedVac. Τα αποξηραμένα πεπτίδια διαλυτοποιήθηκαν σε 10  $\mu$ l κινητής φάσης A (0,1% Μυρμηκικό Οξύ). Ακολούθησε ανάλυση LC-MS/MS.

## 2.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blotting)

---

Το όνομα western blot δόθηκε στην τεχνική από τον Burnette (εναλλακτικά, ανοσοαποτύπωση) και πρόκειται για μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει συγκεκριμένες πρωτεΐνες σε ένα δεδομένο δείγμα ομογενοποιημένου ιστού ή κυττάρων. Χρησιμοποιεί την ηλεκτροφόρηση πήκτωμάτων για να διαχωρίσει τις αποδιαταγμένες ή μη-αποδιαταγμένες πρωτεΐνες με βάση το μέγεθος του πολυπεπτιδίου (αποδιατακτικές συνθήκες) ή από την τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης (μη-αποδιατακτικές συνθήκες). Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται έπειτα σε μια μεμβράνη (χαρακτηριστικά νιτροκυτταρίνης ή PVDF), όπου σημαίνονται (ανιχνεύονται) χρησιμοποιώντας αντισώματα συγκεκριμένα για την πρωτεΐνη στόχου (Burnette 1981).

Η διαδικασία Western blot περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Προετοιμασία δειγμάτων
- Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (PAGE)
- Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- Κορεσμός ελεύθερων ενεργών θέσεων
- Επώαση με αντισώματα
- Ανίχνευση με χημειοφωταύγεια

### 2.3.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (PAGE)

---

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου είναι από τις πλέον συνήθεις τεχνικές διαχωρισμού και προσδιορισμού των φαινομενικών μοριακών βαρών των πρωτεϊνών. Τα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αποτελούνται από αλυσίδες πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου, που διασυνδέονται μεταξύ τους με τη βοήθεια του N,N'-methylene bisacrylamide. Ο πολυμερισμός γίνεται με την παρουσία υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS), το οποίο παρέχει ελεύθερες ρίζες και επιταχύνεται με την προσθήκη N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) που καταλύει το σχηματισμό τους. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πόρων στο πήκτωμα. Το μέγεθος των πόρων, καθώς και το αποτελεσματικό εύρος διαχωρισμού του πηκτώματος εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται κάτω από συνθήκες που εξασφαλίζουν την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις πολυπεπτιδικές υπομονάδες. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται το δωδέκυλο θειικό νάτριο (sodium

dodecyl sulphate, SDS), ένα ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό, μαζί με θέρμανση και συνήθως παρουσία κάποιου αναγωγικού παράγοντα. Το SDS προσδένεται στα αποδιαταγμένα πολυπεπίδια, σε αναλογία μάζας 1.4:1, και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο. Επειδή το ποσοστό του SDS, το οποίο προσδένεται, είναι ανάλογο του M.B. του πολυπεπτιδίου και ανεξάρτητο της αλληλουχίας του, τα σύμπλοκα SDS-πολυπεπίδια μετακινούνται στο πήκτωμα, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, σύμφωνα με το μέγεθός τους. Η παρουσία αναγωγικού παράγοντα, συνήθως μερκαπταιθανόλης ή διθειοθρεϊτόλης, βοηθάει στην αποδιάταξη μιας πρωτεΐνης καταστρέφοντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς.

Τα δείγματα τοποθετούνται σε ένα πήκτωμα μεγάλων πόρων, το πήκτωμα επιστοιβάξης (stacking gel), το οποίο πολυμερίζεται πάνω σε πήκτωμα μικρότερων πόρων, το πήκτωμα διαχωρισμού (resolving/separating gel). Έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σχετικά μεγάλοι όγκοι πρωτεϊνικών δειγμάτων στο πήκτωμα, διατηρώντας πολύ καλή ανάλυση των συστατικών τους. Αυτό συμβαίνει, γιατί οι πρωτεΐνες επιστοιβάζονται κατά τη διάρκεια της μετακίνησης τους, υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου, μέσα από το πήκτωμα επιστοιβάξης, σχηματίζοντας μια μικρή ζώνη πριν την είσοδο τους στο πήκτωμα διαχωρισμού.

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Sambrook et al 1989, το οποίο βασίζεται στο ασυνεχές σύστημα, παρουσία SDS (Laemmli 1970). Παρασκευάστηκε το πήκτωμα διαχωρισμού, περιεκτικότητας σε πολυακρυλαμίδιο 10%, ή 12%, ή 15% (ανάλογα με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που ανιχνεύουμε) και αφέθηκε να πολυμεριστεί στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε το πήκτωμα επιστοιβάξης, περιεκτικότητας σε πολυακρυλαμίδιο 5% και αφέθηκε να πολυμεριστεί πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού. Παράλληλα προετοιμάστηκαν τα πρωτεϊνικά δείγματα. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα τα οποία περιέχουν την ίδια ποσότητα ολικής πρωτεΐνης και προστέθηκε σε αυτά αναγωγικό διάλυμα διαλυτοποίησης σε τελική συγκέντρωση 1x. Τα δείγματα στη συνέχεια θερμάνθηκαν, για 10 λεπτά στους 100°C, και τοποθετήθηκαν στα φρεάτια του πηκτώματος με τη βοήθεια πιπέτας. Επίσης, τοποθετήθηκαν και δείγματα με πρωτεϊνικούς δείκτες γνωστών μοριακών βαρών. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για ~1.5 ώρες, υπό σταθερή τάση 150 Volts, σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, απομακρύνθηκε το πήκτωμα επιστοιβάξης και το πήκτωμα διαχωρισμού χρησιμοποιήθηκε για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

### 2.3.2 Ανοσοαποτύπωση (immunoblotting)

---

Η ανοσοαποτύπωση βασίζεται στη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα του πολυακρυλαμιδίου σε στερεά υποστρώματα, όπως η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Το διάλυμα μεταφοράς περιέχει μεθανόλη, η οποία αυξάνει την ικανότητα δέσμευσης της μεμβράνης και ελαχιστοποιεί το φούσκωμα του πηκτώματος κατά τη μεταφορά. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς είναι αλκαλικό (~8.3), ώστε οι πρωτεΐνες να παραμένουν αρνητικά φορτισμένες. Μετά τη μεταφορά, γίνεται χρώση της μεμβράνης με κατάλληλη χρωστική, η οποία δεν θα επηρεάσει την ανίχνευση που θα ακολουθήσει (π.χ. Ponceau S), για να διαπιστωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Μεγάλη σημασία έχει η μείωση του θορύβου που οφείλεται στη μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων. Αυτό αποφεύγεται με τον κορεσμό των ελευθέρων ενεργών θέσεων, πάνω στη μεμβράνη, με τη χρήση διαφόρων παραγόντων κορεσμού (π.χ. άπαχο ξηρό γάλα). Οι πρωτεΐνες ανιχνεύονται έμμεσα, με τη χρήση ειδικού μη σημασμένου πρωτεύοντος αντισώματος, το οποίο αλληλεπιδρά ειδικά με αντιγονικούς επιτόπους στην υπό εξέταση αποδιαταγμένη πρωτεΐνη και στη συνέχεια με προσθήκη δευτερεύοντος αντισώματος το οποίο είναι συζευγμένο με κάποιο ιχνηθέτη, συνήθως ένζυμο. Ένας από τους ιχνηθέτες που χρησιμοποιούνται είναι η υπεροξειδάση του ραπανιού (horse radish peroxidase, HRP). Η HRP οξειδώνεται παρουσία  $H_2O_2$ , αντιδρά με τη λουμινόλη (luminol) (προκαλώντας την οξείδωση της) και προκαλεί εκπομπή φωτός, η διάρκεια της οποίας ενισχύεται με την παρουσία κάποιου ενισχυτή, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την ευαισθησία του συστήματος. Η εκπομπή γίνεται σε μέγιστο μήκος κύματος περίπου 425-428 nm και αποτυπώνεται σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.

Η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη απαιτεί τη χρήση ειδικής κασέτας (Invitrogen), στο εσωτερικό της οποίας και από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο τοποθετούνταν 4 σφουγγάρια διαστάσεων 9x7 cm, ένα διηθητικό χαρτί Whatman ίδιων διαστάσεων, το gel πολυακρυλαμιδίου, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ένα δεύτερο διηθητικό χαρτί και ακόμα 4 σφουγγάρια. Η μεταφορά έλαβε χώρα σε 1x κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (transfer buffer) συμπληρωμένο με 10% μεθανόλη, σε σταθερές συνθήκες 160mA/25Volts και θερμοκρασίας δωματίου για 1 ώρα. Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μεταφέρθηκε σε διάλυμα χρώσης Ponceau-S, που βάφει μη ειδικά όλες τις πρωτεΐνες, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχής μεταφορά όλων των πρωτεϊνικών ζωνών στη μεμβράνη. Ακολούθησε αποχρωματισμός της μεμβράνης με  $dH_2O$ .

Για τη διεξαγωγή του δεύτερου σταδίου της μεθόδου, την ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών, απαιτείται η επώαση της μεμβράνης με δύο αντισώματα: το πρωτογενές αντίσωμα (primary antibody) που είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που θέλουμε να ανιχνεύσουμε, και το δευτερογενές αντίσωμα (secondary antibody) που αναγνωρίζει ειδικά το πρώτο. Με σκοπό την παρεμπόδιση της μη ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων, η μεμβράνη επώαστηκε αρχικά με διάλυμα blocking (5% dry milk 0.1% Tween20 σε 1x TBS) για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση σε διάλυμα 1% blocking. Η επώαση έλαβε χώρα στους 40C overnight. Την επόμενη ημέρα η νιτροκυτταρίνη ξεπλύθηκε από την περίσσεια του μη προσδεμένου αντισώματος με διάλυμα washing (0.1% Tween20 σε 1x TBS). Πραγματοποιήθηκαν 3 ξεπλύματα 10 λεπτών έκαστο, υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαστηκε με το δευτερογενές αντίσωμα αραιωμένο σε διάλυμα blocking, για 1,5 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα, εκτός της ειδικότητας που έχει για το πρωτογενές, φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης. Μετά την πραγματοποίηση 3 νέων ξεπλυμάτων για την απομάκρυνση της περισσειας και του δευτερογενούς αντισώματος, έγινε η ανίχνευση της πρόσδεσης των αντισωμάτων με τη μέθοδο του ECL (Enhanced Chemiluminescence).

Κατά τη μέθοδο ECL, η λουμινόλη οξειδώνεται παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) από το ένζυμο της υπεροξειδάσης εκπέμποντας φως. Το φως αυτό μπορεί να ανιχνευθεί σε φιλμ αυτοραδιογραφίας. Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το ECL kit της Perkin Elmer. Τα αντιδραστήρια Oxidizing Reagent και Enhanced Luminol Reagent του kit αναμίχθηκαν σε ίση ποσότητα και ακολούθησε επώαση της μεμβράνης με το μείγμα αυτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ειδική κασέτα και εκτίθεντο σε φιλμ για το απαιτούμενο χρονικό διάστημα ανάλογα με την ένταση του σήματος (από λίγα δευτερόλεπτα έως λίγα λεπτά). Η εμφάνιση των φιλμ πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού μηχανήματος που μεσολαβούσε την εμβάπτισή τους σε διαλύματα ανάπτυξης (Developer) και μονιμοποίησης (Fixer). Τέλος, τα φιλμ μετά από σκανάρισμά τους αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Quantity One για την ποσοτικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών. Τα δεδομένα από τις προς μελέτη πρωτεΐνες κανονικοποιήθηκαν με βάση τις τιμές πυκνότητας για την συνολική ποσότητα πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα.

Οι μεμβράνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ξανά και να επωαστούν με διαφορετικό πρωτεύον αντίσωμα, αφού γίνει κατάλληλη επεξεργασία για να

απομακρυνθούν τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για να συγκρίνουμε στα ίδια δείγματα, στις ίδιες πειραματικές συνθήκες και στο ίδιο πείραμα έκφραση διαφορετικών πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας διαφορετικά πρωτεύοντα αντισώματα. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της ECL Western blotting detection reagents (Amersham). Οι μεμβράνες πλύθηκαν με διάλυμα εκπλύσεων 2 φορές για 10 λεπτά και στη συνέχεια επώαστηκαν με διάλυμα που περιείχε 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 2% w/v SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7, για 30 λεπτά στους 50 °C. Έγιναν νέες εκπλύσεις και στη συνέχεια οι μεμβράνες χρησιμοποιήθηκαν ξανά ξεκινώντας από το στάδιο του κορεσμού των μη ειδικών θέσεων, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

## 2.4 Ανοσοφθορισμός

---

Η τεχνική του ανοσοφθορισμού εφαρμόστηκε σε τομές νεφρικού ιστού με σκοπό τη μορφολογική μελέτη ή/και την ποσοτικοποίηση της έκφρασης διάφορων πρωτεϊνών. Η τεχνική βασίζεται στην επώαση του δείγματος με δύο αντισώματα: το πρωτογενές αντίσωμα (primary antibody) που είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που θέλουμε να μελετήσουμε, και το δευτερογενές αντίσωμα (secondary antibody) που αναγνωρίζει ειδικά το πρώτο και φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένη μια φθορίζουσα χρωστική.

Για τη διπλή χρώση τομών νεφρικού ιστού, τομές παραφίνης πάχους 5μm ενυδατώθηκαν με σταδιακή επώαση σε διαλύματα ξυλόλης εις διπλούν, 100% αιθανόλης, 95% αιθανόλης, 70% αιθανόλης και PBS. Στη συνέχεια, οι τομές επώαστηκαν σε διάλυμα 10mM Sodium Citrate pH 6.0 στους 80 °C για 30 λεπτά, με σκοπό την αποκάλυψη κρυμμένων αντιγόνων (antigen retrieval). Ακολουθούσε blocking σε διάλυμα 5% NDS (normal donkey serum) σε PBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν επώαση με τους επιθυμητούς συνδυασμούς πρωτογενών αντισωμάτων σε κατάλληλη αραιώση για 24 ώρες στους 4 °C. Η αντίχνευση των πρωτογενών αντισωμάτων έγινε με επώαση με ειδικά δευτερογενή φθορίζοντα αντισώματα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε χρώση των πυρήνων με τη χρωστική DAPI και μονιμοποίηση με Mowiol 4-88 Reagent και με τοποθέτηση καλυπτρίδας. Τέλος, εικόνες διπλού ανοσοφθορισμού ελήφθησαν στη συνέχεια σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (confocal).



## 2.5 Ανοσοϊστοχημεία

---

Η ανοσοϊστοχημεία αναφέρεται στη διαδικασία εντοπισμού πρωτεϊνών σε κύτταρα από μια τομή ιστών εκμεταλλεύοντας την ιδιότητα των αντισωμάτων να δένονται ειδικά με αντιγόνα σε βιολογικούς ιστούς. Η αλληλεπίδραση αντίγονου-αντισώματος γίνεται ορατή με διάφορους τρόπους και ένας από τους πιο ευρέως διαδεδομένους είναι η χρήση της υπεροξειδάσης συζευγμένη με ένα αντίσωμα καταλύοντας μια χρωμογόνα αντίδραση.

Για τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις χρησιμοποιήθηκαν FFPE τομές νεφρικού ιστού από αρουραίο (μοντέλο SHR και αντίστοιχα control ζώα WKY) πάχους 5μm. Αρχικά οι τομές αποπαραφινώθηκαν και ενυδατώθηκαν με εμβάπτιση σε διαλύματα: ξυλόλης για 15 λεπτά (2x), 100% αιθανόλης για 5 λεπτά (2x), 95% αιθανόλης για 5 λεπτά, 70% αιθανόλης για 5 λεπτά, απεσταγμένο νερό για 3 λεπτά, PBS για 3 λεπτά. Ακολούθησε απενεργοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με επώαση των τομών σε διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% σε μεθανόλη για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι. Στη συνέχεια οι τομές ξεπλύθηκαν σε PBS (2x 15 λεπτά) και επώαστηκαν σε διάλυμα κιτρικού οξέος 0,01M για 30 λεπτά στους 80 °C. Οι τομές αφέθηκαν να κρυώσουν και αφού επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου ακολούθησαν ξεπλύματα με PBS (2x10 λεπτά). Ο κορεσμός των ελευθέρων ενεργών θέσεων προκειμένου να εμποδιστούν οι μη ειδικές συνδέσεις καθώς και η διευκόλυνση εισόδου των αντισωμάτων έγινε με επώαση των τομών σε 5% NDS σε 1x PBS για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια έγινε επώαση με τα πρώτα αντισώματα διαλυμένα σε 1 % NDS σε 1x PBS ή με IgG ίδιας συγκέντρωσης και προέλευσης με το εκάστοτε αντίσωμα, για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν ξεπλύματα με PBS (4x5 λεπτά) και επώαση με τα δεύτερα αντισώματα διαλυμένα σε 1% NDS σε 1x PBS για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα από ένα ξέπλυμα με PBS ακολούθησε η αντίδραση ειδικής χρώσης με τη χρωμοφόρο ένωση 3', 3' diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories, SK- 4100) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Ακολούθησε χρώση των τομών με αιματοξυλίνη για 30 δευτερόλεπτα και αφυδάτωση με εμβάπτιση σε διαλύματα: 70% αιθανόλης για 5 λεπτά, 90% αιθανόλης για 5 λεπτά, 100% αιθανόλης για 5 λεπτά (2x), ξυλόλης για 10 λεπτά. Οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν με κάλυψη με καλυπτρίδα με την ειδική μονιμοποιητική κόλλα DPX.

## 2.6 Laser Capture Microdissection

---

Η απομόνωση των νεφρικών αγγείων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική Laser Capture Microdissection. Η τεχνική πραγματοποιήθηκε με το σύστημα PALM Microbeam Laser System (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany). Το σύστημα είναι εξοπλισμένο με λέιζερ UV-A, μικροσκόπιο και ηλεκτρονικό υπολογιστή. Χρησιμοποιήθηκαν κρυοτομές νεφρού από τα υπερτασικά SHR και νορμοτασικά WKY ζώα (N=4 για κάθε ομάδα) 20 εβδομάδων. Οι τομές πάχους 14  $\mu\text{m}$  βρίσκονταν σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες επικαλυμμένες με μια βιοχημικώς αδρανή μεμβράνη (PALM Membrane slides NF 1.0 PEN). Οι τομές χρωματίστηκαν ελαφρά με αιματοξυλίνη Gill προκειμένου να διακρίνονται οι επιμέρους δομές του νεφρού. Τα νεφρικά αγγεία και ένας μικρός αριθμός σπειραμάτων που εμφάνιζαν προσαγωγό και απαγωγό αρτηρίδιο απομονώθηκαν με την χρήση του laser. Η διαδικασία περιελάμβανε την παρατήρηση της χρωματισμένης τομής στο μικροσκόπιο του συστήματος PALM και με την χρήση του υπολογιστή γινόταν η επιλογή της περιοχής προς απομόνωση. Στη συνέχεια το UV-A λέιζερ έκοβε την μαρκαρισμένη περιοχή. Τα απομονωμένα κομμάτια από τις νεφρικές τομές συλλέγονταν σε ειδικά eppendorfs και φυλάγονταν στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  για την περαιτέρω ανάλυση. Η συνολική περιοχή του νεφρικού παρεγχύματος που αντιστοιχούσε σε αγγεία και που απομονώθηκε από κάθε ζώο ήταν περίπου  $10,000,000 - 14,000,000\ \mu\text{m}^2$ , όπως μετρήθηκε από το PALM Microbeam Laser σύστημα. Από τα απομονωμένα τμήματα πραγματοποιήθηκε εκχύλιση πρωτεϊνών, μετρήθηκε η συγκέντρωσή τους και στη συνέχεια τα δείγματα προετοιμάστηκαν για την τεχνική GeLC-MS.

## 2.7 Τεχνικές ανάλυσης RNA

---

### 2.7.1 Απομόνωση RNA

---

Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε από τμήματα νεφρού ( 40-50 mg) που είχαν φυλαχθεί στους  $-80^{\circ}\text{C}$  με χρήση του αντιδραστηρίου TRI Reagent (Invitrogen). Όλη η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε απαγωγό υπό άσηπτες συνθήκες. Ο ιστός ομογενοποιήθηκε και η λύση των κυττάρων έγινε σε 1ml Trizol μέσα σε γυάλινο σωλήνα με τη βοήθεια κατάλληλου εμβόλου (Wheaton dounce homogenizer). Μετά τη λύση τα δείγματα συλλέχθηκαν σε 1,5 ml eppendorfs και προστέθηκαν σε αυτά 100 μl BCP (1-bromo-3-chloropropan). Ακολούθησε έντονη ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000 rpm για 15 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$  με σκοπό τον διαχωρισμό της υδατικής και της οργανικής φάσης. Το υπερκείμενο που περιείχε το RNA μεταφέρθηκε σε νέα eppendorfs όπου προστέθηκαν 500 μl ισοπροπανόλη με καλή ανάμιξη. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρωση στις 12.000 rpm για 10 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$  με σκοπό την κατακρήμνιση του RNA. Μετά τη φυγοκέντρωση απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα του RNA ξεπλύθηκε με 70% αιθανόλη και φυγοκεντρήθηκε εκ νέου στις 7500 rpm για 10 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Τέλος, το ίζημα που περιείχε το RNA αφέθηκε να στεγνώσει στον αέρα για λίγα λεπτά και επαναδιαλύθηκε σε 40 μl νερό ελεύθερο ριβονουκλεασών (RNases) .

### 2.7.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA

---

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA έγινε με φωτομέτρηση των δειγμάτων σε φωτόμετρο ThermoSpectronic (Biomate). Τα δείγματα αρχικά αραιώθηκαν και στη συνέχεια μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm. Η οπτική απορρόφηση στα 260 nm μας επιτρέπει τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA στο δείγμα. Οπτική απορρόφηση (OD) ίση με 1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 40 μg μονόκλωνου RNA/ml αραιωμένου διαλύματος. Ο λόγος μεταξύ των απορροφήσεων στα 260 nm και στα 280 nm (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) δείχνει την καθαρότητα του RNA και θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 2.0. Μικρότερες τιμές του λόγου των απορροφήσεων δείχνουν την παρουσία πρωτεϊνών στο διάλυμα του RNA. Η συγκέντρωση των δειγμάτων προσδιορίστηκε από τον τύπο: [RNA μg/μl]=OD<sub>260</sub> x 40 x αραιώση δείγματος.

Επειδή είναι πιθανόν κατά την απομόνωση του RNA να απομονωθεί και γενετικό υλικό DNA, προκειμένου να αποκωδομηθούν τα υπολείμματα DNA έγινε κατεργασία των

απομονωμένων δειγμάτων RNA με το ένζυμο DNase (Promega). Σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 5μg RNA, 3 μl 10x διάλυμα αντίδρασης, 3 μl DNaseI και dH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 30 μl. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 37 °C για 1 ώρα και στη συνέχεια σε καθένα από αυτά προστέθηκε 1 μl DNase Stop Solution για τον τερματισμό της αντίδρασης και έγινε επώαση στους 65 °C για 15 λεπτά για την απενεργοποίηση του ενζύμου. Ακολούθησε νέα φωτομέτρηση των δειγμάτων.

### **2.7.3 Σύνθεση cDNA**

Η σύνθεση του cDNA έγινε με την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής με τη χρήση του ενζύμου MMLV (Promega). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε eppendorfs των 200μl όπου για κάθε δείγμα προστέθηκαν 1 μg RNA, 1 μl μίγματος τυχαίων εκκινητών (random primers) 0,5 μg/μl και dH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 13 μl. Τα δείγματα επώαστηκαν για 5 λεπτά στο 70 °C και για 5 λεπτά στους 4 °C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4 μl 5x διαλύματος αντίδρασης, 2 μl dNTPs 10mM και 1 μl ενζύμου. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 1 ώρα για τη σύνθεση του cDNA και στους 70 °C για 15 λεπτά για την απενεργοποίηση του ενζύμου. Όλες οι αντιδράσεις σύνθεσης cDNA πραγματοποιήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή MJ Research PTC-200 (Marshall Scientific).

### **2.7.4 RT-qPCR: Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου**

Στη μοριακή βιολογία, η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR), είναι μία τεχνική όπου βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάζει και να ποσοτικοποιεί το επιθυμητό μόριο DNA. Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι το πολλαπλασιασμένο DNA ποσοτικοποιείται καθώς συγκεντρώνεται στην αντίδραση σε πραγματικό χρόνο μετά από κάθε κύκλο πολλαπλασιασμού. Οι δύο πιο συνηθισμένες μέθοδοι για την ποσοτικοποίηση είναι: α) SYBR Green I: Ο φθορισμός επιτυγχάνεται καθώς οι φθορίζουσες χρωστικές προσδένονται στα δίκλινα μόρια DNA. Στο τέλος της φάσης επιμήκυνσης το ποσό του DNA μετράται από το σήμα που δίνει το SYBR Green I β) Hybridization Probes: Ειδικά σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια DNA τα οποία φθορίζουν όταν υβριδοποιηθούν με συμπληρωματικά μόρια DNA. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου συνδυάζεται με την αντίστροφη μεταγραφή για την ποσοτικοποίηση του mRNA σε κύτταρα και ιστούς.

Η αντίδραση της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR) πραγματοποιήθηκε υπό άσηπτες συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα. Οι αντιδράσεις έγιναν σε πιάτα 96 θέσεων (96 well plate)

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο Lightcycler 96 (Roche) σύμφωνα με το παρακάτω πρόγραμμα: επώαση στους 95 °C για 10 λεπτά και επώαση για 45 κύκλους στους 95 °C για 10 δευτερόλεπτα, 60 °C για 15 δευτερόλεπτα και 72 °C για 15 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε ανάλυση καμπυλών τήξης (melting curve analysis), με μετρήσεις κάθε 1 °C από τους 65 °C έως τους 96 °C προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία ενός μόνο προϊόντος στην αντίδραση. Για την ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων η έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων κανονικοποιήθηκε με βάση το γονίδιο GAPDH χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ΔΔCT.

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο του συµµεταφορέα SGLT2:

F1:ATCTGACCGCCGGAGTGATT

R1:CCGGAGAACATATCCACCGAGAT

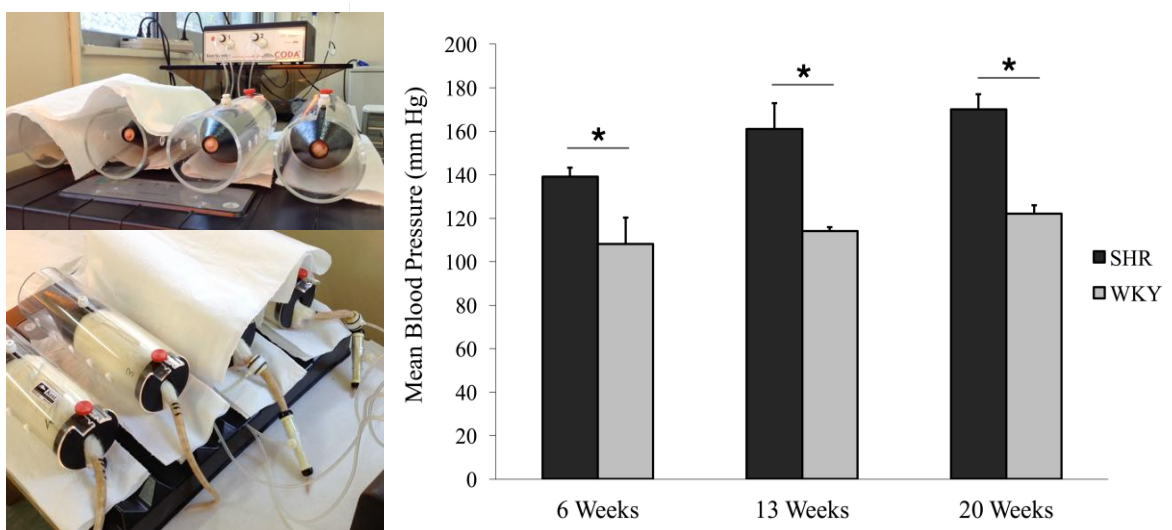
F2: GGAAGGCTCTGAACTTGGGG

R2: AGACCACAAGCCAACACCAA

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Μέση αρτηριακή πίεση των ζώων

Η μέτρηση της μέσης αρτηριακής πίεσης των πειραματόζωων πριν την θυσία τους ήταν απαραίτητη προϋπόθεση για την μετέπειτα μελέτη (Εικόνα 8α). Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις επιβεβαιώνουν την ανάπτυξη υπέρτασης από την ηλικιακή ομάδα των 6 εβδομάδων (Εικόνα 8β). Τα SHR ζώα 6 εβδομάδων είχαν σημαντικά αυξημένη μέση αρτηριακή πίεση σε σχέση με τα αντίστοιχα WKY ζώα (Mann-Whitney U test,  $p < 0.05$ ). Στις ηλικίες των 13 και 20 εβδομάδων τα SHR ζώα είχαν σταθερά μέση αρτηριακή πίεση 160-170 mmHg ενώ τα αντίστοιχα WKY ζώα παρέμειναν νορμοτασικά με μέση αρτηριακή πίεση κάτω από 120 mmHg και στις τρεις ηλικιακές ομάδες.



**Εικόνα 8:** *α)* Μέτρηση της μέσης αρτηριακής πίεσης. Τα ζώα αρχικά ακινητοποιήθηκαν και στη συνέχεια ακολούθησε η μέτρηση της πίεσης από την ουρά τους χρησιμοποιώντας την τεχνική Computerized rat tail-cuff (Kent Scientific, Co., Torrington, CT, USA). *β)* Μέση αρτηριακή πίεση των υπέρτασικών SHR (μαύρο) και νορμοτασικών WKY (γκρι) ζώων. Και στις τρεις ηλικιακές ομάδες τα SHR ζώα εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη μέση αρτηριακή πίεση (Mean blood pressure) σε σχέση με τα WKY ζώα. ( $n=8$  για κάθε ηλικιακή ομάδα, Mann-Whitney U test, \*  $p < 0.05$ )

### 3.2 Ιστοπαθολογικά ευρήματα

---

Μετά τη μέτρηση της πίεσης των ζώων και την θυσία τους οι νεφροί απομονώθηκαν και ακολούθησε μελέτη τους για την παρατήρηση ιστοπαθολογικών ευρημάτων του νεφρικού παρεγχύματος λόγω της υπέρτασης. Για το σκοπό αυτό νεφρικές τομές υπερτασικών και νορμοτασικών ζώων απ' όλες τις ηλικιακές ομάδες αξιολογήθηκαν για χαρακτηριστικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις χρησιμοποιώντας κατάλληλα πρωτόκολλα χρώσης (Hematoxylin and Eosin, Periodic acid-Schiff and Masson's trichrome staining). Οι αξιολογήσεις επικεντρώθηκαν στο μέγεθος των σπειραμάτων, την εστιακή σπειραματοσκλήρυνση, τη μεσαγγειακή κυτταρικότητα, την σωληναριακή ατροφία, την διόγκωση των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων, την διάμεση ίνωση, την διάμεση φλεγμονή, την υαλίνωση και την πάχυνση του αρτηριακού έσω χιτώνα.

Όλες αυτές οι παράμετροι βρέθηκαν σχεδόν αμετάβλητες τόσο στα υπερτασικά όσο και στα νορμοτασικά ζώα και των τριών ηλικιακών ομάδων, εκτός από μια ελαφρά αύξηση της μεσαγγειακής κυτταρικότητας, την παρουσία ενδιάμεσης φλεγμονής και μια ελαφρά πάχυνση του αρτηριακού έσω χιτώνα στα υπερτασικά ζώα όλων των ηλικιών. Το γεγονός αυτό δεν προκαλεί έκπληξη, δεδομένου ότι η μελέτη μας διεξήχθη σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης της υπέρτασης στο μοντέλο SHR και τα ιστοπαθολογικά ευρήματα είναι σύμφωνα με προηγούμενα δημοσιευμένα δεδομένα για αυτό το ζωικό μοντέλο. Τυπικά, η σωληναριακή ατροφία και η διάμεση ίνωση είναι μια αργή εξέλιξη της νεφρικής βλάβης και στο μοντέλο SHR εμφανίζεται στην ηλικία μεταξύ 30 και 60 εβδομάδων, πολύ αργότερα δηλαδή από την ηλικία των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή [28].

Επομένως, το συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο υπέρτασης και οι ηλικιακές ομάδες των 6, 13 και 20 εβδομάδων που επιλέχθηκαν κρίθηκαν κατάλληλα για την εύρεση πιθανόν πρώιμων βιοδεικτών υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης διότι στα ζώα αυτών των ηλικιών ναί μεν έχει εγκαθιδρυθεί η υπέρταση όμως, δεν έχουν εμφανιστεί οι τυπικές βλάβες που προκαλούνται από αυτή στην δομή και την λειτουργία του νεφρού.

### 3.3 Πρωτεομική ανάλυση

---

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο της Εισαγωγής η πρωτεομική ανάλυση ως μέθοδος ολιστικής προσέγγισης είναι πολύ χρήσιμη για την εύρεση μορίων με πιθανό κρίσιμο ρόλο κατά την παθογένεση της υπέρτασης. Για τον λόγο αυτό εφαρμόσαμε τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις πρωτεομικής ανάλυσης στο μοντέλο SHR και στην αντίστοιχη ομάδα ελέγχου WKY σε τρεις διαφορετικές ηλικιακές ομάδες (6, 13 και 20 εβδομάδων). Ο στόχος ήταν να βρεθούν μόρια με κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη υπέρτασης και που πιθανόν να αποτελέσουν στο μέλλον πρώιμους δείκτες υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης.

Τα αποτελέσματα από όλες τις πρωτεομικές αναλύσεις που εφαρμόσαμε στο πειραματικό μοντέλο SHR και την ομάδα ελέγχου WKY παρουσιάζονται αναλυτικά στις επόμενες ενότητες.

#### 3.3.1 Αποτελέσματα 2DE MALDI-MS

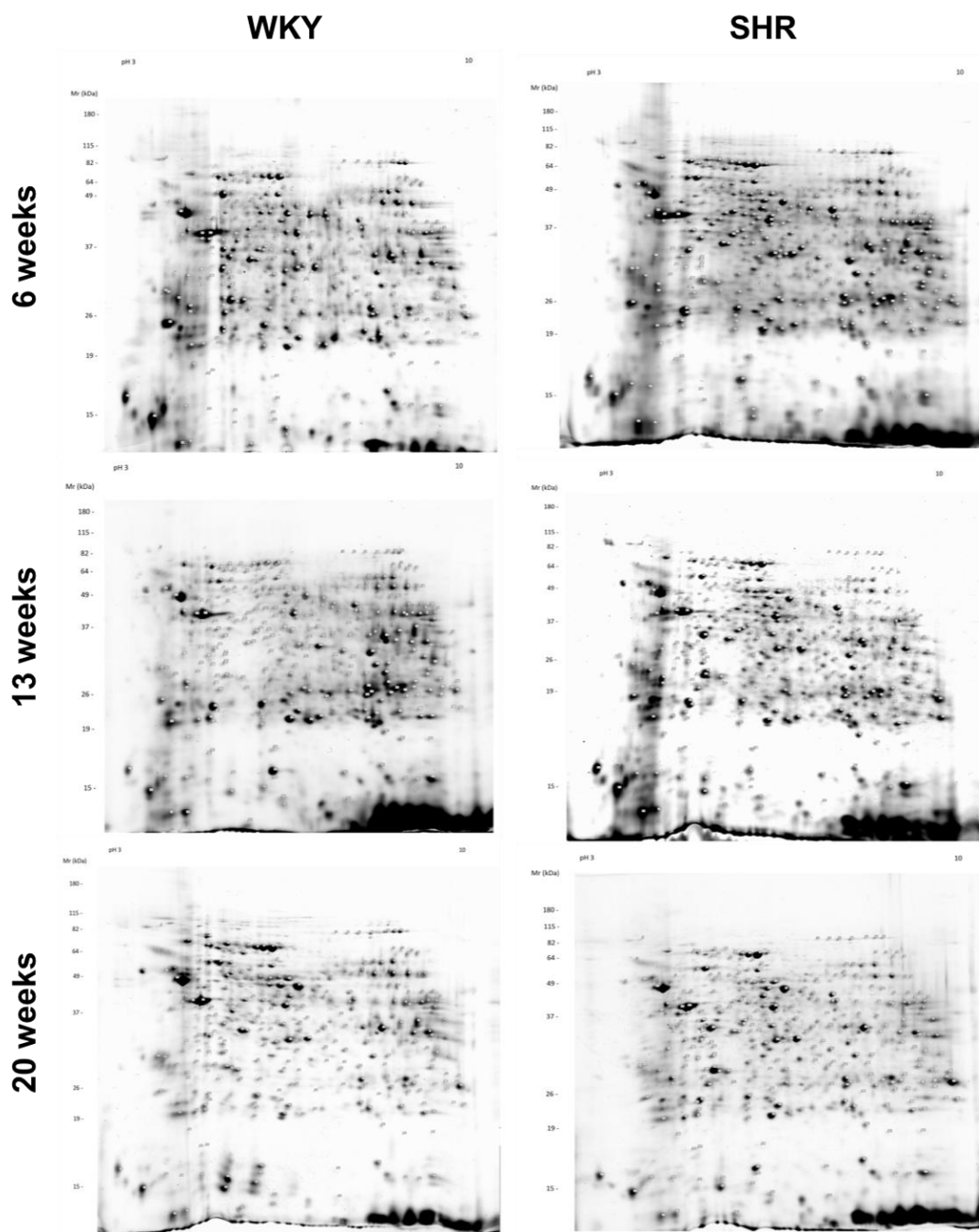
---

Από την δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση 2DE των πρωτεϊνικών δειγμάτων από τα WKY και SHR ζώα σε τρία διαφορετικά στάδια ανάπτυξης (6, 13 και 20 εβδομάδων) προέκυψαν οι χαρακτηριστικοί πρωτεομικοί χάρτες (Εικόνα 9). Αντιπροσωπευτικές εικόνες από κάθε ηλικιακή ομάδα SHR ζώων επιλέχθηκαν και συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα των WKY. Αναλύθηκαν 4 πηκτώματα ανά κατηγορία και ανά ηλικία που αντιστοιχούσαν σε διαφορετικά ζώα-βιολογικά αντίγραφα. Η ανάλυση και η σύγκριση των εικόνων αυτών κατέδειξε σημαντικές διαφορές στο πρωτεομικό προφίλ των υπερτασικών ζώων σε σύγκριση με τα νορμοτασικά και στις τρεις ηλικίες που μελετήθηκαν. Από την σύγκριση ανιχνεύθηκαν εκείνες οι πρωτεϊνικές κηλίδες που παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές στην ένταση κατά την σύγκριση των υπερτασικών και νορμοτασικών ζώων. Ακολούθησε η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που αντιστοιχούσαν σε κάθε κηλίδα στα πηκτώματα και προσδιορίστηκαν εκείνες οι πρωτεΐνες που είχαν διαφορετική έκφραση στα υπερτασικά ζώα.



### ***3.3.1.1 Διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που προέκυψαν από την 2DE και MALDI-MS ανάλυση***

Στην ηλικία των 6 εβδομάδων κατά την οποία στο μοντέλο SHR η υπέρταση έχει αρχίσει να αναπτύσσεται, εντοπίστηκαν 84 διαφορικά εκφραζόμενες κηλίδες από τις οποίες οι 61 παρουσίαζαν αύξηση και οι 23 μείωση στα υπερτασικά ζώα SHR. Στην ηλικία των 13 εβδομάδων κατά την οποία έχει εγκαθιδρυθεί η υπέρταση στο μοντέλο SHR, εντοπίστηκαν 131 κηλίδες με διαφορική έκφραση από τις οποίες 127 παρουσίαζαν αύξηση στα υπερτασικά και μόνο 4 παρουσίαζαν μείωση. Τέλος, στα ζώα 20 εβδομάδων εντοπίστηκαν 159 διαφορικά εκφραζόμενες κηλίδες από τις οποίες 32 παρουσίαζαν αύξηση και 127 παρουσίαζαν μείωση με την υπέρταση.



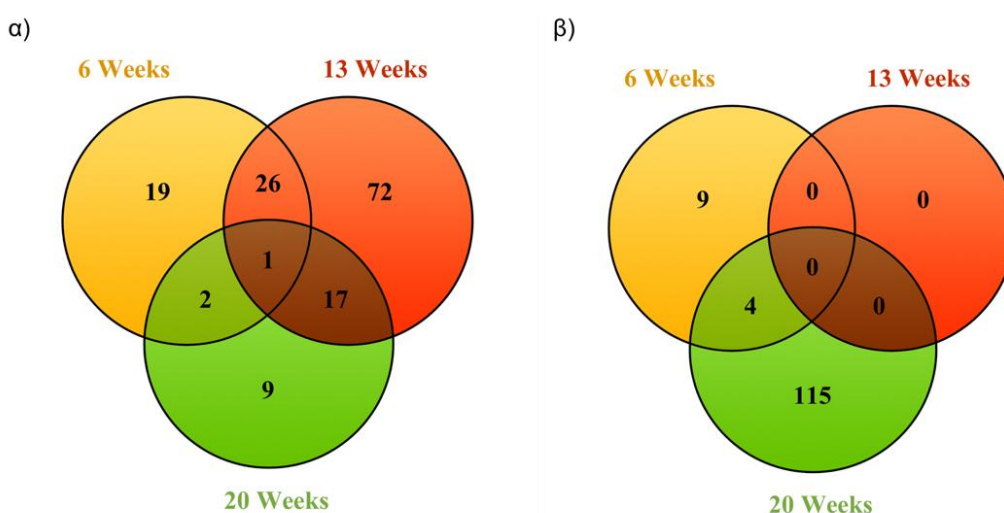
*Εικόνα 9: Αντιπροσωπευτικές εικόνες 2D από τους πρωτεομικούς χάρτες των υπέρτασικών SHR και νορμοτασικών WKY ζώων ηλικίας 6, 13 και 20 εβδομάδων που απεικονίζουν τις πρωτεϊνικές κηλίδες.*

Οι πρωτεΐνες που αντιστοιχούσαν στις κηλίδες αυτές ταυτοποιήθηκαν με MALDI-MS. Συνολικά, 288 κηλίδες έδωσαν αξιόπιστα αποτελέσματα ταυτοποίησης πρωτεϊνών (Πίνακας Παραρτήματος 1). Σε πολλές από τις πρωτεομικές κηλίδες ταυτοποιήθηκε η ίδια πρωτεΐνη γεγονός που υποδηλώνει πιθανές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Δεδομένου ότι τα εργαλεία βιοπληροφορικής ανάλυσης δεν έχουν την δυνατότητα να

αναγνωρίσουν και ξεχωρίσουν τις τροποποιημένες πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκε η συνολική διαφορική έκφραση ανά πρωτεΐνη για την επακόλουθη βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης. Τα αποτελέσματα των συνολικών διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν στα υπερτασικά ζώα σε σύγκριση με τα νορμοτασικά μετά την ενοποίησή τους για τις κηλίδες που ταυτοποιήθηκαν ως η ίδια πρωτεΐνη παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 και στην Εικόνα 10.

Ηλικία	Αυξημένη έκφραση	Μειωμένη έκφραση	Σύνολο
6 εβδομάδες	48	13	61
13 εβδομάδες	116	0	116
20 εβδομάδες	29	119	148

**Πίνακας 1:** Ο συνολικός αριθμός των πρωτεϊνών που βρέθηκαν στο νεφρικό παρέγχυμα των SHR ζώων ανά ηλικία και που εμφανίζουν αυξημένη ή μειωμένη έκφραση στα υπερτασικά ζώα σε σύγκριση με το νορμοτασικά, όπως προέκυψε από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής με τη μέθοδο 2DE MALDI-MS.



**Εικόνα 10:** Διαγράμματα Venn που απεικονίζουν τις κοινές διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που βρέθηκαν στις τρεις ηλικιακές ομάδες ζώων SHR μετά την πρωτεομική ανάλυση με τη μέθοδο 2DE MALDI-MS. α) Οι κοινές πρωτεΐνες με αυξημένη έκφραση στα υπερτασικά ζώα ανά ηλικιακή ομάδα. β) Οι κοινές πρωτεΐνες με μειωμένη έκφραση στα υπερτασικά ζώα ανά ηλικιακή ομάδα.

Μετά την ταυτοποίηση των διαφορεικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών ακολούθησε η βιοπληροφορική ανάλυση ώστε να βρεθούν τα βιολογικά μονοπάτια που εμπλέκονται οι πρωτεΐνες αυτές και τα οποία απορρυθμίζονται στα υπερτασικά ζώα.

### **3.3.1.2 Βιοπληροφορική ανάλυση αποτελεσμάτων δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης**

---

Η βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης και του MALDI-MS πραγματοποιήθηκε με τα εργαλεία IPA (Ingenuity Pathway Analysis) και Cytoscape ClueGO [51,52].

Με την ανάλυση IPA εντοπίστηκαν σημαντικές βιολογικές διεργασίες οι οποίες σχετίζονται με τις διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες και για τις τρεις διαφορετικές ηλικίες που μελετήθηκαν: 6 εβδομάδες (Πίνακας Παραρτήματος 2), 13 εβδομάδες (Πίνακας Παραρτήματος 3) και 20 εβδομάδες (Πίνακας Παραρτήματος 4).

Τα σημαντικότερα ευρήματα από τη σύγκριση των ζώων 6 εβδομάδων ήταν τα μονοπάτια:

- NRF2-mediated Oxidative Stress Response
- Mitochondrial dysfunction
- Oxidative phosphorylation
- Glutathione transferase activity

Στις 13 εβδομάδες οι βιολογικές διεργασίες που βρέθηκαν να επηρεάζονται είναι:

- Apoptosis
- Detoxification of Reactive Oxygen Species
- Glutathione transferase activity
- Remodelling of Epithelial Adherens Junctions
- Gap Junction Signalling
- 14-3-3-Mediated Signalling
- Agrin interactions at Neuromuscular Junction
- Noradrenaline and Adrenaline Degradation.

Στην ηλικία των 20 εβδομάδων οι σημαντικότερες βιολογικές διεργασίες που βρέθηκαν να επηρεάζονται είναι:

- Fatty Acid  $\alpha$ -oxidation
- Detoxification of reactive Oxygen Species
- Junction related processes

- Dopamine degradation
- Mitochondrial Dysfunction

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως υπάρχει ένα μοτίβο εξέλιξης από το οξειδωτικό στρες και την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στην εμφάνιση απόπτωσης και σημαντικών μεταβολών στις διακυτταρικές διασυνδέσεις που εμφανίζονται κυρίως στα ζώα 13 και 20 εβδομάδων.

Επιπλέον, η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με το Cytoscape ClueGo αποκάλυψε πως οι διαφορετικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες στα ζώα 6 εβδομάδων εμπλέκονται σε βιολογικά μονοπάτια που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες όπως:

- Glutathione oxidoreductase activity
- Regulation of superoxide metabolic process
- L-ascorbic acid biosynthesis
- Branched-amino acid catabolism
- Glucose metabolism
- TCA cycle

Στις 13 εβδομάδες βρέθηκαν τα ακόλουθα μονοπάτια:

- Glutathione transferase activity
- Cellular respiration
- TCA cycle
- Amino acid synthesis and interconversion

Στις 20 εβδομάδες βρέθηκαν τα ακόλουθα μονοπάτια:

- Reactive oxygen species metabolic process
- Fatty acid degradation
- TCA cycle
- Metabolism of amino acids

Τα μονοπάτια που σχετίζονται περισσότερο με την φυσιολογία των νεφρών καθώς και οι πρωτεΐνες που βρέθηκαν να εμπλέκονται σε αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Biological Process	p-value	Differentially expressed proteins
Glutathione metabolism	$4.7 \times 10^{-6}$ (6w), $1.2 \times 10^{-3}$ (13w)	Gclm, Gsta1, Gsta3, Gstm3, Gsto1, Idh1, Idh2
Glutathione transferase activity	$1.6 \times 10^{-4}$ (6w), $2.1 \times 10^{-4}$ (13w)	Gsta1, Gsta3, Gstm3, Gsto1, Clic1, Clic4
Glutathione binding	$4.9 \times 10^{-4}$ (6w)	Gsta1, Gsta3, Gstm3
Apoptosis	$7.3 \times 10^{-3}$ (13w)	Casp3, Lmna, Sptan1, Vim, Ywhae
Detoxification of reactive oxygen species	$1.7 \times 10^{-3}$ (13w), $3.4 \times 10^{-4}$ (20w)	Cat, P4hb, Prdx3, Sod2, Prdx2, Prdx6, Sod1
Mitochondrial protein complex	$8.4 \times 10^{-3}$ (13w)	Atp5h, Bckdha, Cox5a, Ndufa10, Sdha, Sdhb, Uqcrc1
Mitochondrial respiratory chain	$3 \times 10^{-3}$ (13w)	Cox5a, Ndufa10, Sdha, Sdhb, Uqcrc1
Mitochondrial matrix	$8.4 \times 10^{-16}$ (20w)	Acaa2, Acadl, Acadm, Acadvl, Acat1, Agxt2, Aldh1a1, Aldh2, Aldh4a1, Dlat, Dld, Glud1, Hadh, Hadhb, Hspa9, Hspd1, Ivd, Ndufa10, Pc, Suclg2, Tufm, Vdac1
Mitochondrial fatty acid beta-oxidation of saturated fatty acids	$2.8 \times 10^{-6}$ (20w)	Acadl, Acadm, Acadvl, Hadh, Hadhb
Mitochondrial fatty acid beta-oxidation	$1.8 \times 10^{-5}$ (20w)	Acadl, Acadm, Acadvl, Hadh, Hadhb
Mitochondrial nucleoid	$1.8 \times 10^{-3}$ (20w)	Acadvl, Hadhb, Hspa9, Tufm, Vdac1
Mitochondrial intermembrane space	$1.1 \times 10^{-2}$ (20w)	Aifm1, Cat, Sod1, Suox, Timm9

**Πίνακας 2:** Οι βιολογικές διεργασίες που βρέθηκαν να απορρυθμίζονται στα υπερτασικά ζώα και οι διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτά.

### 3.3.2 Αποτελέσματα LC-MS/MS ανάλυσης

Μετά την πρώτη ανάλυση με 2DE-MALDI-MS, επαναλάβαμε την πρωτεωμική ανάλυση στα ίδια ζώα εφαρμόζοντας την τεχνική LC-MS/MS που διακρίνεται από υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με την 2DE-MALDI-MS και επομένως επιτρέπει την αναγνώριση ακόμη περισσότερων πρωτεϊνών. Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των

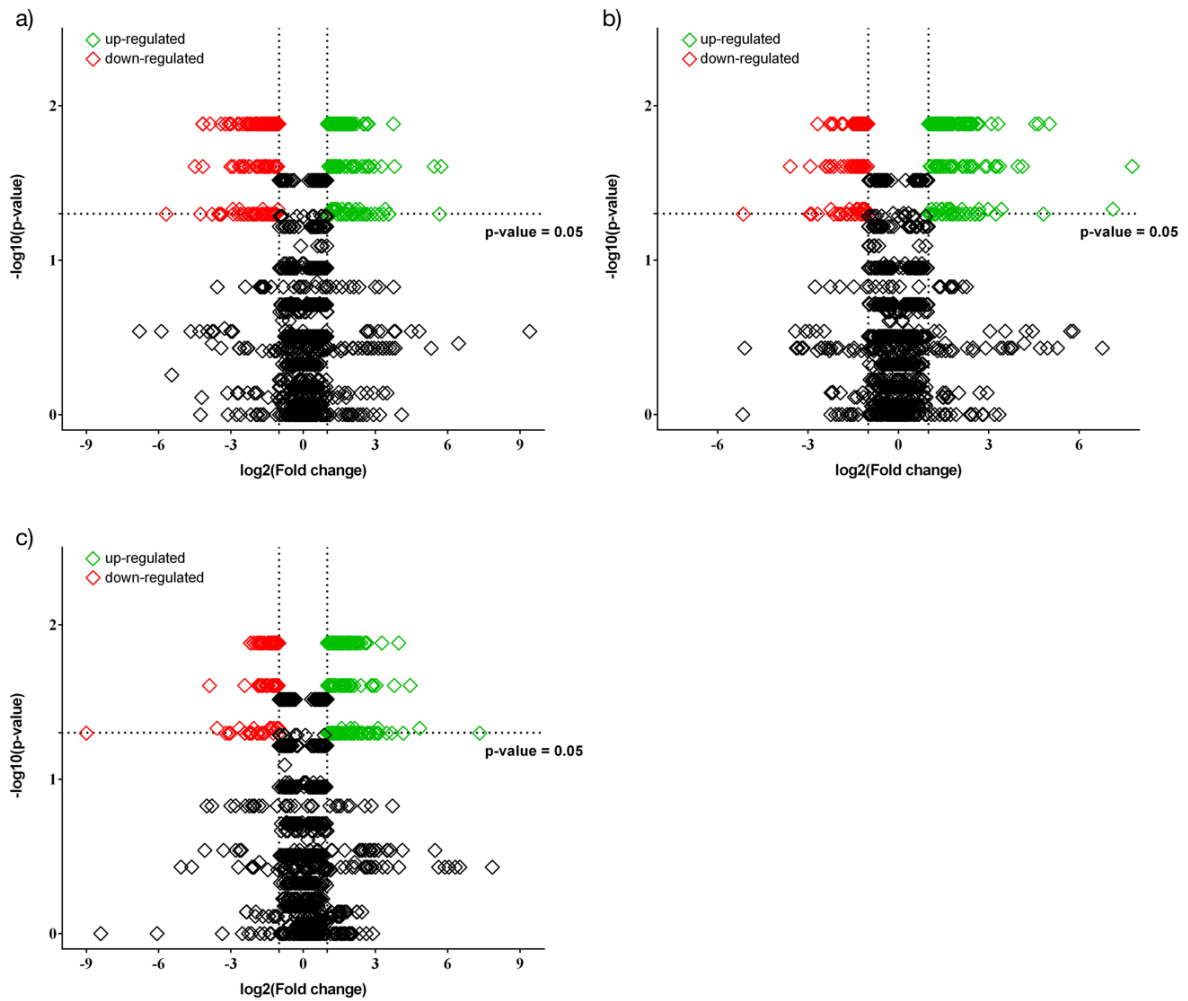
πρωτεϊνών του νεφρικού παρεγχύματος πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 4 βιολογικά δείγματα υπερτασικών SHR και 4 νορμοτασικών WKY ανά ηλικιακή ομάδα (6, 13 και 20 εβδομάδες). Αναγνωρίστηκαν συνολικά 1393 πρωτεΐνες στην ηλικία των 6 εβδομάδων, 1383 πρωτεΐνες στην ηλικία των 13 εβδομάδων και 1395 πρωτεΐνες στην ηλικία των 20 εβδομάδων. Επόμενο βήμα ήταν να αναγνωριστούν πόσες από τις πρωτεΐνες αυτές παρουσίαζαν διαφορετική έκφραση στα υπερτασικά.

### 3.3.2.1 Διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που προέκυψαν από την LC-MS/MS ανάλυση

Ως διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες θεωρήθηκαν εκείνες που πληρούσαν τα δύο ακόλουθα κριτήρια: i) ήταν στατιστικά σημαντικά με  $p\text{-value} \leq 0.05$  (Mann-Whitney), και ii) ο λόγος έκφρασης ήταν μεγαλύτερος από 2 (για τις πρωτεΐνες που η έκφρασή τους αυξανόταν στα υπερτασικά ζώα) ή μικρότερος από 0.5 (για τις πρωτεΐνες που η έκφρασή τους ήταν μικρότερη στα υπερτασικά σε σύγκριση με τα νορμοτασικά ζώα). Αναγνωρίστηκαν πάνω από 300 πρωτεΐνες με διαφορετική έκφραση σε κάθε ηλικιακή ομάδα υπερτασικών ζώων που μελετήθηκε. Ο συνολικός αριθμός των διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών που αναγνωρίστηκαν ανά ομάδα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 και τα συνολικά αποτελέσματα στους Πίνακες Παραρτήματος 5-10. Η γραφική απεικόνιση του συνόλου των πρωτεϊνών που αναγνωρίστηκαν κατά την πρωτεομική ανάλυση παρουσιάζεται στις ακόλουθες εικόνες.

Ηλικία	Αυξημένη έκφραση	Μειωμένη έκφραση	Σύνολο
<b>6 εβδομάδες</b>	198	165	363
<b>13 εβδομάδες</b>	192	126	318
<b>20 εβδομάδες</b>	206	119	325

**Πίνακας 3:** Το σύνολο των διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών στο νεφρικό παρέγχυμα των SHR ζώων ανά ηλικία όπως προέκυψε από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής με τη μέθοδο LC-MS/MS.

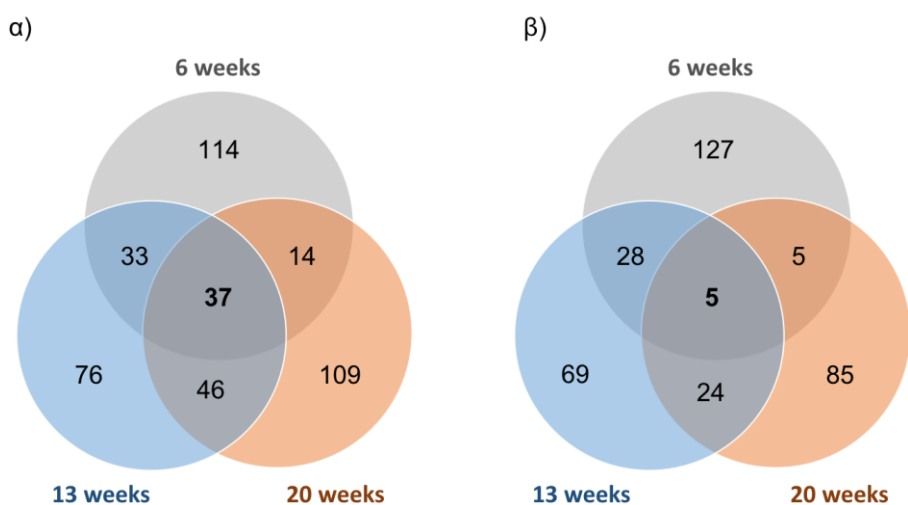


**Εικόνα 11:** Γραφική απεικόνιση του συνολικού αριθμού των πρωτεϊνών και των διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών που αναγνωρίστηκαν στα ζώα 6 εβδομάδων (a), 13 εβδομάδων (b) και 20 εβδομάδων (c) κατά την πρωτεομική ανάλυση με βάση το  $\log_2$  του λόγου έκφρασης και το  $-\log_{10}$  του p-value. Με πράσινο χρώμα διακρίνονται οι στατιστικά σημαντικές πρωτεΐνες με αυξημένη έκφραση στα υπερτασικά ζώα SHR και με κόκκινο χρώμα οι στατιστικά σημαντικές πρωτεΐνες με μειωμένη έκφραση.

Από το σύνολο των διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3, 42 παρουσιάζουν είτε αποκλειστικά αυξημένη έκφραση είτε αποκλειστικά μειωμένη έκφραση και στις τρεις ηλικιακές ομάδες. Ειδικότερα, 37 πρωτεΐνες έχουν αυξημένη έκφραση και στις τρεις ομάδες υπερτασικών ζώων (Εικόνα 12α, Πίνακας 4) ενώ 5 πρωτεΐνες έχουν μειωμένη έκφραση (Εικόνα 12β, Πίνακας 5). Στην Εικόνα 12 παρουσιάζονται τα διαγράμματα Venn με το σύνολο των διαφορικά εκφραζόμενων



πρωτεϊνών που ήταν κοινές στις διαφορετικές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων ζώων διαφορετικής ηλικίας.



**Εικόνα 12:** Διαγράμματα Venn που απεικονίζουν τις κοινές διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που βρέθηκαν στις τρεις ηλικιακές ομάδες ζώων SHR μετά την πρωτεομική ανάλυση με LC-MS/MS. **α)** Οι κοινές πρωτεΐνες με αυξημένη έκφραση στα υπερτασικά ζώα ανά ηλικιακή ομάδα. Στην ανάλυση περιλαμβάνονται μόνο οι πρωτεΐνες με λόγο έκφρασης > 2 και  $p \leq 0.05$ . **β)** Οι κοινές πρωτεΐνες με μειωμένη έκφραση στα υπερτασικά ζώα ανά ηλικιακή ομάδα. Στην ανάλυση περιλαμβάνονται μόνο οι πρωτεΐνες με λόγο έκφρασης < 0.5 και  $p \leq 0.05$

Accession	Protein	6 weeks		13 weeks		20 weeks	
		p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio
Q6SKG1	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM3, mitochondrial	0,025	43,33	0,013	23,55	0,047	28,47
Q9QYL8	Acyl-protein thioesterase 2	0,025	2,52	0,025	2,33	0,025	7,15
P29410	Adenylate kinase 2, mitochondrial	0,013	2,03	0,013	2,02	0,013	2,52
P23928	Alpha-crystallin B chain	0,013	2,87	0,013	3,44	0,013	2,79
Q7TP52	Carboxymethylenebutenolidase homolog	0,013	2,09	0,013	5,36	0,013	5,87
P47875	Cysteine and glycine-rich protein 1	0,025	4,35	0,013	2,68	0,025	2,06
Q7TQ16	Cytochrome b-c1	0,025	6,66	0,025	15,69	0,050	160,60

	complex subunit 8						
Q2TL32	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	0,025	4,38	0,013	2,36	0,013	5,28
O55159	Epithelial cell adhesion molecule	0,013	3,51	0,013	3,14	0,013	4,89
Q9WUH4	Four and a half LIM domains protein 1	0,013	2,19	0,013	3,50	0,013	3,10
Q62839	Golgin subfamily A member 2	0,013	3,05	0,025	4,52	0,025	3,21
Q7TSE9	HCLS1-associated protein X-1	0,050	8,89	0,025	2,32	0,013	2,10
Q4QQW3	Hydroxyacid-oxoacid transhydrogenas, mitochondrial	0,013	6,32	0,025	9,26	0,013	4,28
P22791	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial	0,047	3,82	0,025	2,53	0,013	2,10
P41498	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	0,013	5,70	0,013	25,39	0,013	2,31
P97700	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	0,013	2,39	0,013	3,30	0,013	2,59
Q9WV97	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9	0,025	2,93	0,013	2,34	0,013	2,67
P10111	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	0,013	2,85	0,013	3,84	0,013	3,64
Q9Z0V5	Peroxisredoxin-4	0,047	2,54	0,050	28,23	0,050	7,81
Q9WVK3	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	0,013	2,76	0,013	4,10	0,013	2,99
P63004	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	0,013	2,35	0,013	4,61	0,013	2,26
A1A5S1	Pre-mRNA-processing factor 6	0,013	3,96	0,013	5,56	0,013	2,12
P18421	Proteasome subunit beta type-1	0,013	2,35	0,013	2,61	0,025	2,89
P20650	Protein phosphatase 1A	0,013	2,20	0,025	3,01	0,025	7,52
Q5XFW8	Protein SEC13 homolog	0,025	2,30	0,025	3,23	0,050	6,60
B0BNC9	Quinone oxidoreductase-like protein 2	0,013	3,57	0,013	4,00	0,013	2,67
Q66H68	RNA-binding protein 47	0,050	5,97	0,050	5,83	0,025	2,23
P22509	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	0,047	2,71	0,013	3,49	0,050	10,99

P02770	Serum albumin	0,013	2,78	0,013	2,98	0,013	2,76
P53792	Sodium/glucose cotransporter 2	0,050	11,82	0,013	2,92	0,013	9,63
O70594	Solute carrier family 22 member 5	0,013	3,96	0,013	5,16	0,013	3,74
O54861	Sortilin	0,013	2,95	0,025	7,71	0,025	2,01
Q07116	Sulfite oxidase, mitochondrial	0,013	2,29	0,013	4,82	0,013	4,54
P07632	Superoxide dismutase	0,013	6,49	0,013	4,82	0,013	2,72
P24329	Thiosulfate sulfurtransferase	0,013	2,27	0,013	3,95	0,013	2,07
P04692	Tropomyosin alpha-1 chain	0,025	7,71	0,025	9,64	0,047	8,61
Q63610	Tropomyosin alpha-3 chain	0,013	2,53	0,013	2,60	0,013	3,56

**Πίνακας 4:** Οι πρωτεΐνες από την ανάλυση με LC-MS/MS που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στα υπερτασικά ζώα SHR και είναι κοινές και στις τρεις ηλικίες που μελετήθηκαν.

Accession	Protein	6 weeks		13 weeks		20 weeks	
		p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio
O35795	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	0,025	0,48	0,050	0,30	0,025	0,34
P04905	Glutathione S-transferase Mu 1	0,013	0,12	0,013	0,16	0,013	0,33
Q01984	Histamine N-methyltransferase	0,013	0,40	0,013	0,43	0,013	0,39
Q5BKD0	Inactive 2'-5'-oligoadenylate synthase 1B	0,025	0,21	0,050	0,13	0,050	0,19
Q562C6	Leucine zipper transcription factor-like protein 1	0,025	0,34	0,025	0,13	0,025	0,49

**Πίνακας 5:** Οι πρωτεΐνες από την ανάλυση με LC-MS/MS που παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση στα υπερτασικά ζώα SHR και είναι κοινές και στις τρεις ηλικίες που μελετήθηκαν.

### **3.3.2.2 Βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων από το LC-MS/MS**

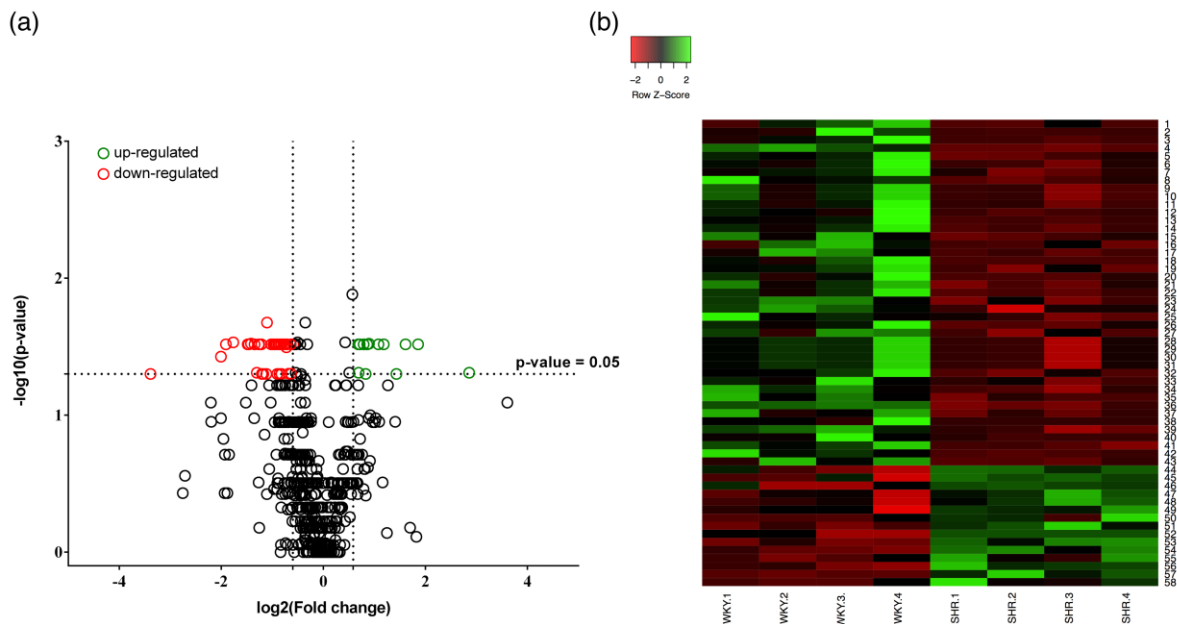
---

Η βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων από το LC-MS/MS πραγματοποιήθηκε με το εργαλείο Cytoscape ClueGO [51,52]. Η ανάλυση των διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών αποκάλυψε μονοπάτια που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (detoxification of reactive oxygen species), την απόπτωση (activation of BH3-only proteins, activation of BAD and translocation to mitochondria, activation of BIM and translocation to mitochondria) και τον μεταβολισμό (the citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport, pyruvate metabolism and TCA cycle, metabolism of amino acids and derivatives).

### **3.3.3 Αποτελέσματα Laser Capture Microdissection**

---

Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών που εκφράζονται αποκλειστικά στα νεφρικά αγγεία πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 4 βιολογικά δείγματα υπερτασικών SHR και 4 βιολογικά δείγματα νορμοτασικών WKY 20 εβδομάδων. Από την πρωτεομική ανάλυση με τη μέθοδο GeLC-MS/MS στα νεφρικά αγγεία αναγνωρίστηκαν συνολικά 688 πρωτεΐνες από τις οποίες 71 βρέθηκαν αποκλειστικά στα νορμοτασικά WKY, 67 βρέθηκαν αποκλειστικά στα υπερτασικά SHR ενώ 550 ήταν κοινές και στις δύο ομάδες. Από τις 550 κοινές πρωτεΐνες που αναγνωρίστηκαν, 58 πρωτεΐνες είχαν διαφορετική έκφραση στα SHR. Συγκεκριμένα, 15 πρωτεΐνες είχαν αυξημένη έκφραση (Πίνακας Παραρτήματος 11) και 43 είχαν μειωμένη έκφραση (Πίνακας Παραρτήματος 12) στα νεφρικά αγγεία των SHR σε σύγκριση με τα νορμοτασικά WKY. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής παρατίθεται στην Εικόνα 13.



**Εικόνα 13:** **a)** Γραφική απεικόνιση του συνολικού αριθμού των πρωτεϊνών των νεφρικών αγγείων που αναγνωρίστηκαν κατά την πρωτεομική ανάλυση με βάση το  $\log_2$  του λόγου έκφρασης και το  $-\log_{10}$  του  $p$ -value. **b)** Απεικόνιση με τη μορφή *heat map* των 58 διαφορεικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Όπως αναφέρθηκε, η πρωτεομική ανάλυση με την τεχνική GeLC-MS/MS οδήγησε στην αναγνώριση πολλών πρωτεϊνών. Από την βιοπληροφορική ανάλυση καθώς και από τη μελέτη της σχετικής βιβλιογραφίας για τις πρωτεΐνες αυτές προέκυψε πως πολλές από τις πρωτεΐνες που βρέθηκαν διαφορετικά εκφραζόμενες στα νεφρικά αγγεία των υπερτασικών ζώων σχετίζονται με την ρύθμιση του αγγειακού τόνου και της αρτηριακής πίεσης. Ορισμένες από αυτές τις πρωτεΐνες καθώς και στοιχεία για καθεμία από αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Γονίδιο	Πρωτεΐνη	p-value	Λόγος έκφρασης (SHR/WKY)	Λειτουργία	Αναφορά
<b>Qdpr</b>	Dihydropteridine reductase	0.03	3.05	BH4 regeneration	[53,54]
<b>Ddah1</b>	N(G), N(G)-dimethylarginine dimethylamino-hydrolase 1	0.05	1.77	ADMA hydrolase	[55]
<b>Cfl1</b>	Cofilin-1	0.03	1.6	Cytoskeletal remodeling	[56]

<b>Xpnpep 1</b>	Xaa-Pro aminopeptidase 1	0.05	0.64	Bradykinin degradation	[57,58]
<b>Pah</b>	Phenylalanine-4-hydroxylase	0.04	0.62	Tyrosine generation	[59]
<b>Enpep</b>	Glutamyl aminopeptidase/Aminopeptidase A	0.05	0.53	Metabolism of AngII	[60]
<b>Anpep</b>	Aminopeptidase N	0.03	0.37	Metabolism of AngIII	[61]
<b>Calb1</b>	Calbindin	0.05	0.46	Calcium-binding protein	[62]
<b>Calb2</b>	Calretinin	0.05	0.55	Calcium-binding protein	[63]
<b>Phb</b>	Prohibitin	0.03	0.24	ROS formation	[64,65]
<b>Phb2</b>	Prohibitin-2	0.03	0.43	Mitochondrial function	[66]

*Πίνακας 6: Ορισμένες από τις διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που αναγνωρίστηκαν στα υπερτασικά ζώα και σχετίζονται με την ρύθμιση του αγγειακού τόνου και της αρτηριακή πίεσης.*

### 3.4 Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής ανάλυσης

---

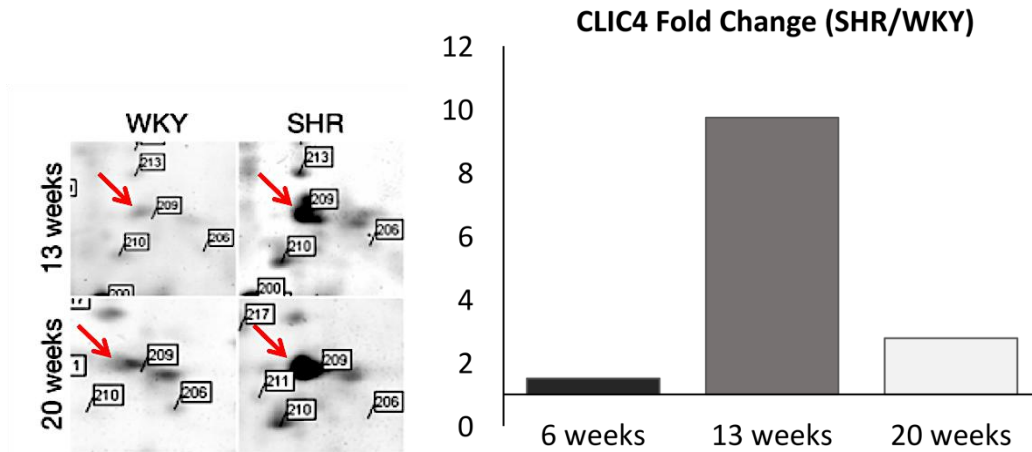
Η πρωτεομική ανάλυση που εφαρμόσαμε στο υπερτασικό μοντέλο SHR και τα αντίστοιχα νορμοτασικά ζώα WKY τόσο με τη μέθοδο 2DE-MALDI-MS όσο και με τη μέθοδο LC-MS/MS οδήγησε στην αναγνώριση μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών με διαφορετική έκφραση στα υπερτασικά ζώα. Επειδή ο αριθμός των πρωτεϊνών αυτών ήταν μεγάλος και ήταν αδύνατον να μελετήσουμε την καθεμία ξεχωριστά επικεντρωθήκαμε σε εκείνες μόνο τις διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που ήταν κοινές στα ζώα όλων των ηλικιών. Από τις κοινές πρωτεΐνες, επιλέξαμε δύο, τις CLIC4 και SGLT2, για την περαιτέρω μελέτη και την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής. Η επιλογή τους δεν ήταν τυχαία αλλά με βάση την λειτουργία τους και βιβλιογραφικά δεδομένα που θα αναλυθούν παρακάτω. Τα ευρήματα για τις δύο αυτές πρωτεΐνες παρουσιάζονται στις επόμενες ενότητες.

#### 3.4.1 Επιβεβαίωση των ευρημάτων της πρωτεομικής ανάλυσης για την πρωτεΐνη CLIC4

---

Από την λεπτομερή ανάλυση των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής ανάλυσης με 2DE-MALDI-MS επιλέχθηκε η πρωτεΐνη CLIC4 για περαιτέρω μελέτη. Η επιλογή έγινε με βάση τις εξής παρατηρήσεις: 1) η CLIC4, όπως προέκυψε από την πρωτεομική ανάλυση, βρέθηκε να είναι σημαντικά αυξημένη στα υπερτασικά ζώα όλων των ηλικιών (6, 13 και 20 εβδομάδων) (Εικόνα 14) 2) η CLIC4, όπως προέκυψε από την βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής, συμμετέχει στο μονοπάτι ενεργότητας της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (transferase glutathione activity pathway) το οποίο απορρυθμίζεται στα υπερτασικά ζώα όπως φαίνεται στον Πίνακα 2 και 3) η βιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης CLIC4 ως κανάλι μεταφοράς ιόντων χλωρίου παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον και μπορεί να εμπλέκεται στην ανάπτυξη της υπέρτασης.

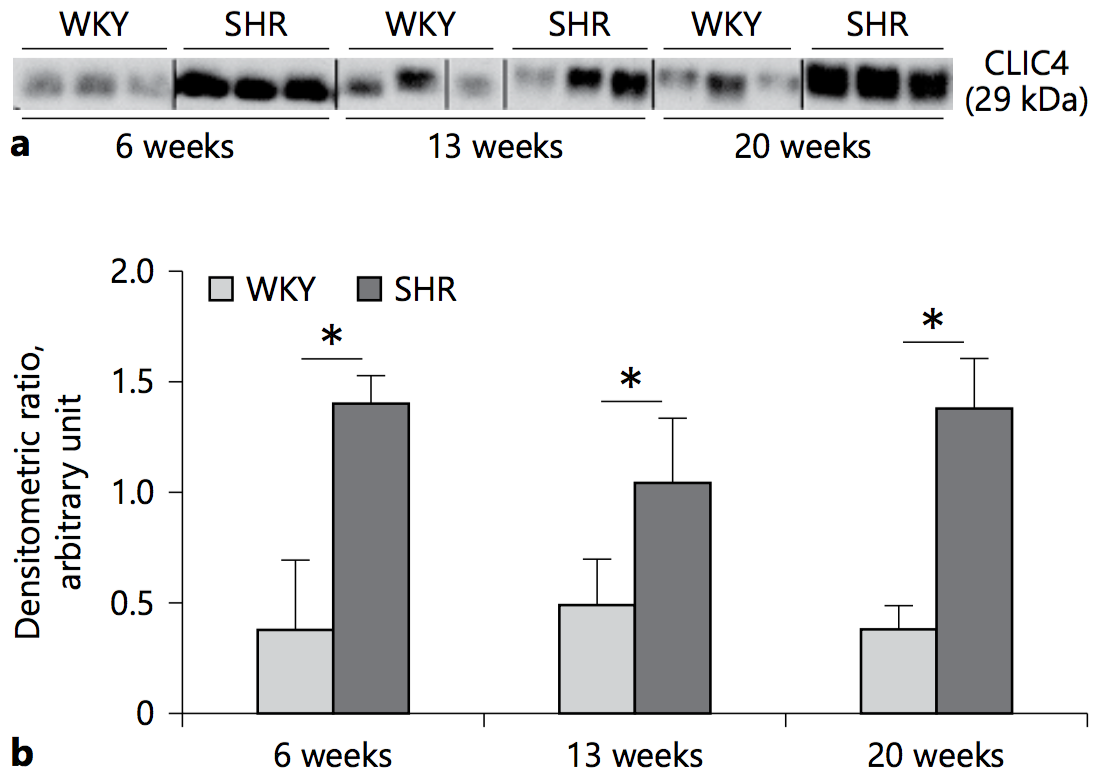
Στην πρωτεομική ανάλυση με 2DE MALDI-MS η CLIC4 βρέθηκε σημαντικά αυξημένη στα υπερτασικά ζώα 6, 13 και 20 εβδομάδων με λόγω έκφρασης 1.5, 9.74 και 2.77 αντίστοιχα (Εικόνα 14). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν στατιστικά σημαντικά με  $p$ -value < 0.05.



**Εικόνα 14:** Αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης με 2DE MALDI-MS για την πρωτεΐνη CLIC4. Με κόκκινα βέλη υποδεικνύεται η κηλίδα που αντιστοιχεί στην CLIC4 σε κάθε πήκτωμα. Η έκφραση της CLIC4 αυξάνεται σημαντικά στα υπέρτασικά ζώα 6, 13 και 20 εβδομάδων με λόγω έκφρασης 1.5, 9.74 και 2.77 αντίστοιχα ( $p$ -value < 0.05).

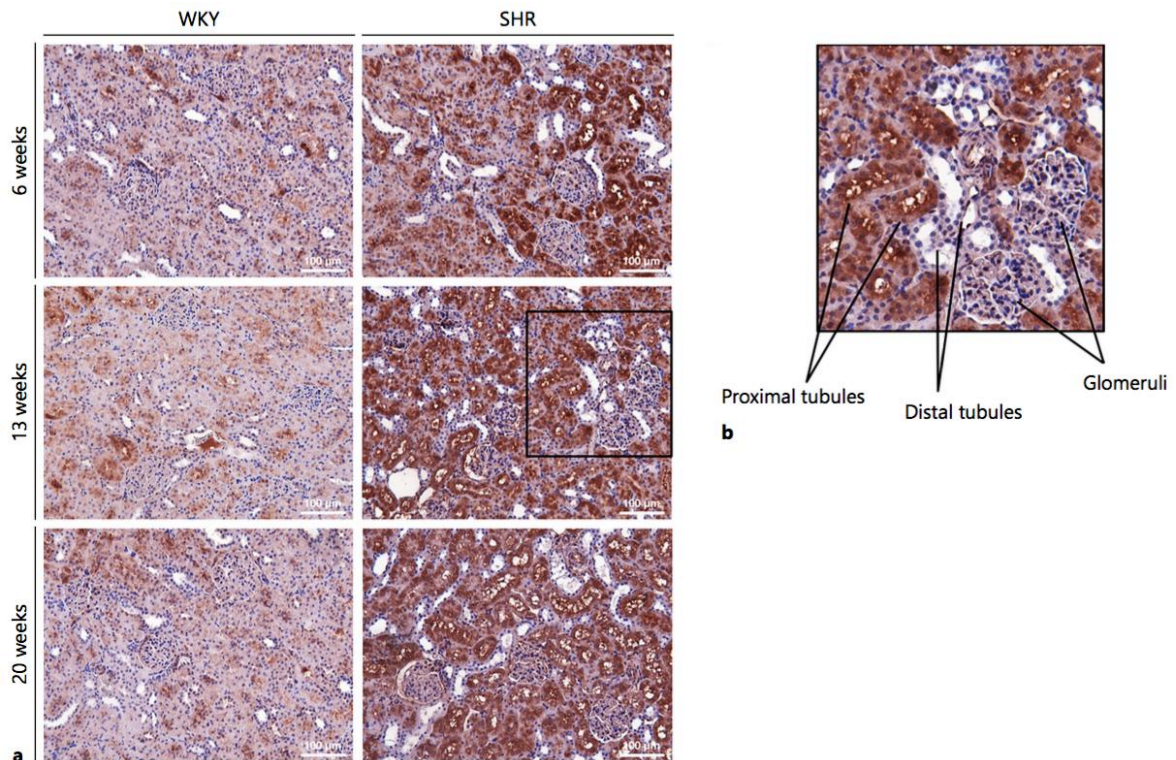
Αρχικά, για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής για την πρωτεΐνη CLIC4 εφαρμόστηκε η ανοσοαποτύπωση κατά Western. Αναλύθηκαν τα ίδια πρωτεϊνικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν και για την 2DE-MALDI-MS ανάλυση. Τα αποτελέσματα της Western blot συνοψίζονται στην Εικόνα 15. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν τα αντίστοιχα ευρήματα της πρωτεομικής ανάλυσης για την πρωτεΐνη CLIC4 και επιβεβαιώνουν την υπερέκφρασή της στα υπέρτασικά ζώα όλων των ηλικιών.



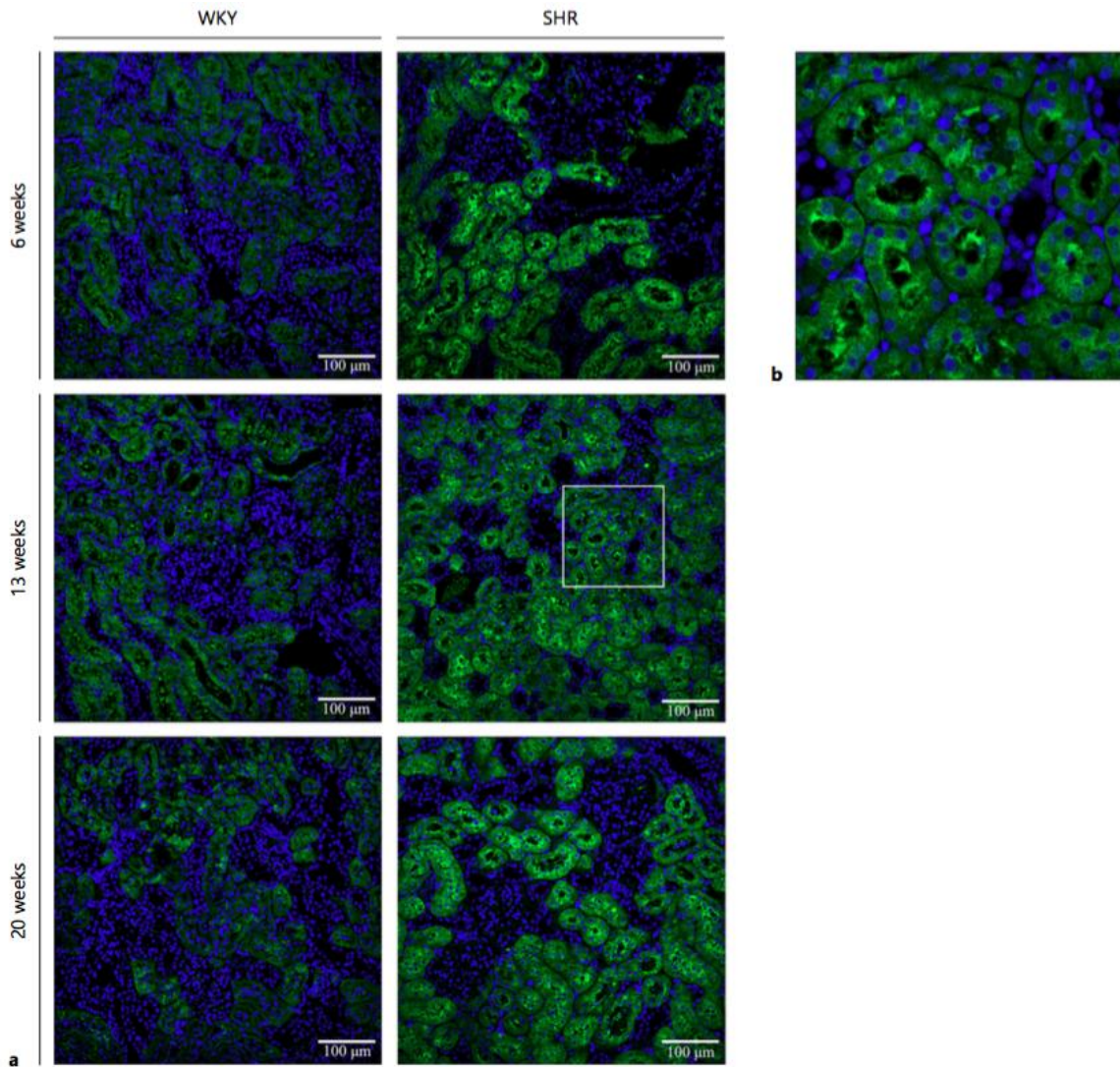


**Εικόνα 15:** Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής ανάλυσης για την πρωτεΐνη CLIC4 με ανοσοαποτύπωση κατά Western. **a)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες 3 βιολογικών αντιγράφων παρουσιάζονται για κάθε ομάδα ζώων. Η ζώνη της πρωτεΐνης CLIC4 ήταν η μόνη παρατηρούμενη ζώνη στην αναμενόμενη κινητικότητα των 29kDa. **b)** Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης κατά Western όπου επιβεβαιώνεται η υπερέκφραση της πρωτεΐνης CLIC4 στα υπερτασικά ζώα και στις τρεις ηλικίες.

Δεδομένου ότι η ανοσοαποτύπωση κατά Western επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της πρωτεομικής για την πρωτεΐνη CLIC4 το επόμενο βήμα στη μελέτη μας ήταν να εντοπίσουμε σε ποια επακριβώς κύτταρα του νεφρικού παρεγχύματος εκφράζεται η συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν μελέτες ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού σε νεφρικές τομές FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) με τη χρήση ειδικού αντισώματος για την CLIC4. Στις Εικόνες 16 και 17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας και του ανοσοφθορισμού όπου φαίνεται η διαφορά στην έκφραση της CLIC4 στο νεφρικό παρέγχυμα των υπερτασικών ζώων.



**Εικόνα 16:** *a)* Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοϊστοχημείας για την πρωτεΐνη *CLIC4* από υπερτασικά και νορμοτασικά ζώα 6, 13 και 20 εβδομάδων. Διακρίνεται ξεκάθαρα η αυξημένη έκφραση της *CLIC4* στο νεφρικό παρέγχυμα των υπερτασικών ζώων όλων των ηλικιών. *b)* Μεγέθυνση του νεφρικού παρεγχύματος υπερτασικού ζώου 13 εβδομάδων. Η αυξημένη έκφραση της *CLIC4* εντοπίζεται μόνο στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια. Συγκεκριμένα, είναι αυξημένη τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στην ψυκτροειδή παρυφή των επιθηλιακών σωληναριακών κυττάρων. Στα σπειράματα και στα υπόλοιπα τμήματα του νεφρόνα όπως τα άπω εσπειραμένα σωληνάρια, η αγκύλη του Henle και τα αθροιστικά σωληνάρια δεν φαίνεται να εντοπίζεται η *CLIC4*.



**Εικόνα 17:** *a)* Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού για την πρωτεΐνη CLIC4 στα υπέρτασικά SHR και νορμοτασικά WKY ζώα 6, 13 και 20 εβδομάδων. *b)* Μεγέθυνση του νεφρικού παρεγχύματος υπέρτασικού ζώου 13 εβδομάδων όπου φαίνεται η κατανομή του σήματος φθορισμού. Η CLIC4 εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων και παρουσιάζει αυξημένη κατανομή προς τον αυλό των εγγύς σωληναρίων, δηλαδή στην ψυκτροειδή παρυφή των κυττάρων τους.

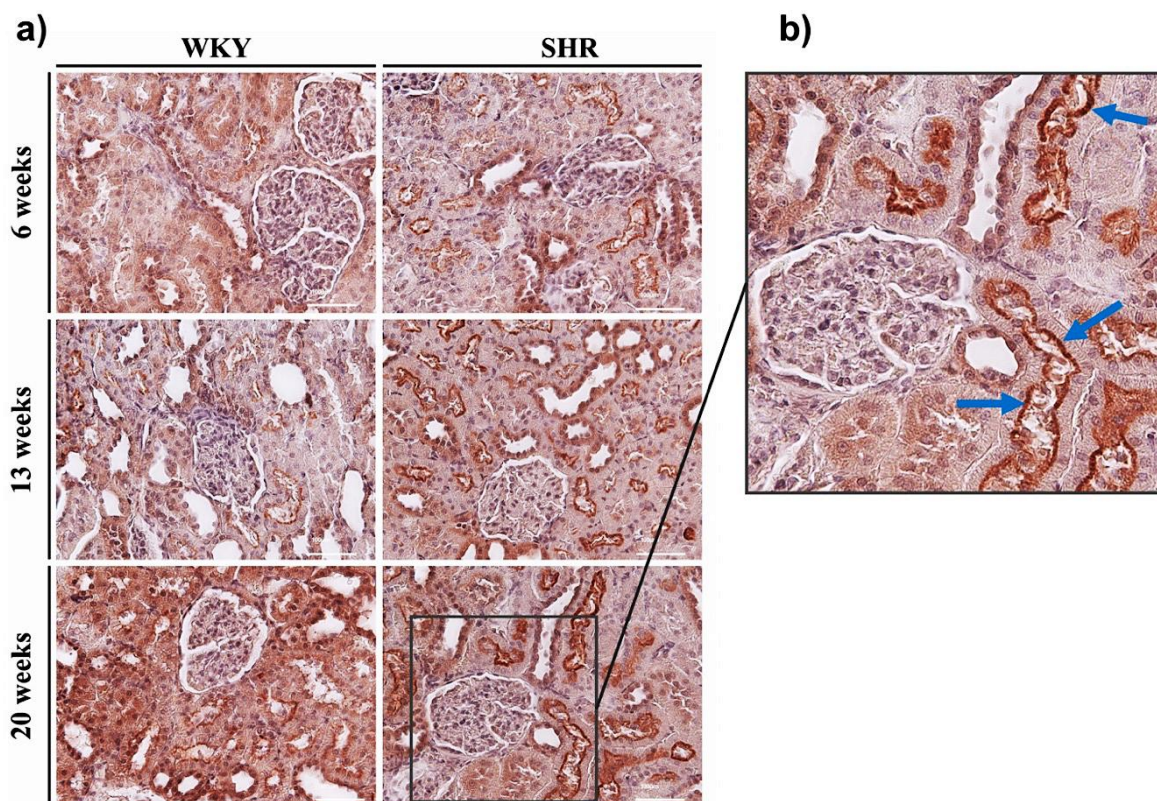
Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν περαιτέρω υποστήριξη στα ευρήματα της πρωτεομικής ανάλυσης και της Western blot για την CLIC4 πρωτεΐνη, ότι δηλαδή υπερεκφράζεται σε όλα τα υπέρτασικά ζώα. Επιπλέον, δείχνουν ότι η υπερέκφραση της CLIC4 εντοπίζεται αποκλειστικά στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων. Ειδικότερα, η CLIC4 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των σωληναριακών

κυττάρων ενώ είναι σημαντικό να τονιστεί πως υπάρχει αυξημένη κατανομή του σήματος στην ψυκτροειδή παρυφή (brush border) των κυττάρων αυτών. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι η CLIC4 δεν εντοπίστηκε να εκφράζεται στα σπειράματα και στα άλλα τμήματα των σωληναρίων του νεφρικού παρεγχύματος (Εικόνες 16β, 17β).

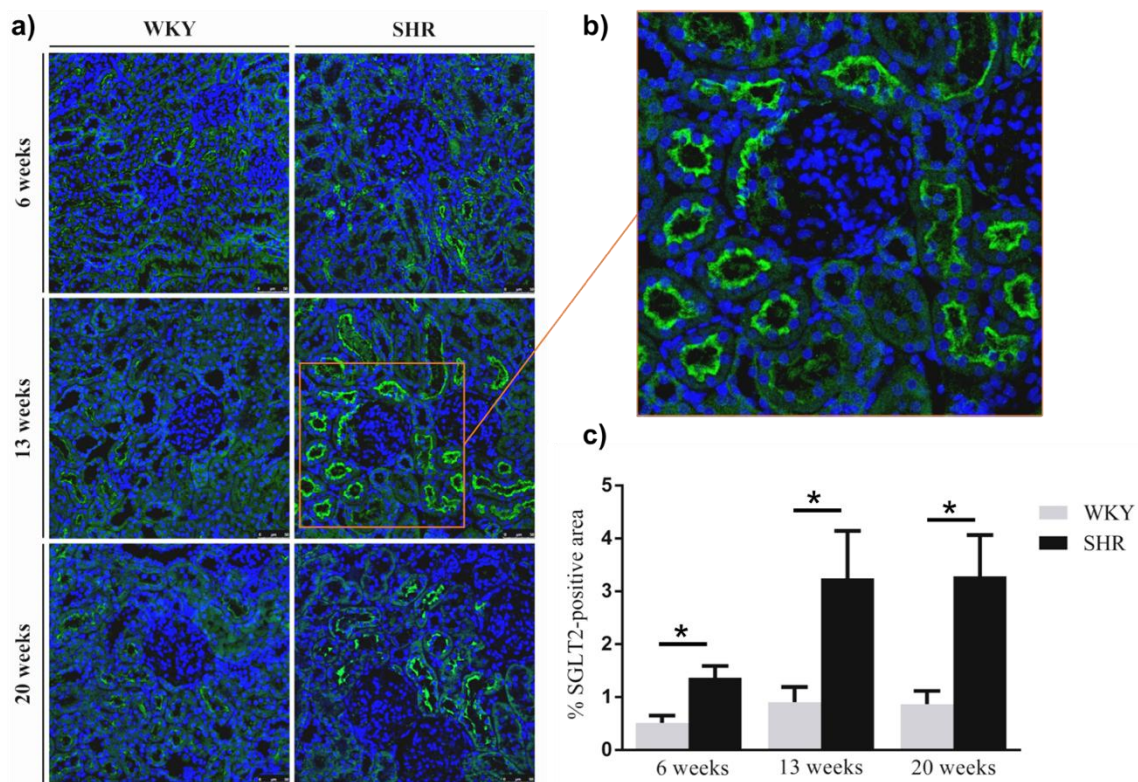
### 3.4.2 Επιβεβαίωση των ευρημάτων της πρωτεομικής ανάλυσης για την πρωτεΐνη SGLT2

Η πρωτεομική ανάλυση του νεφρικού παρεγχύματος με τη μέθοδο LC-MS/MS οδήγησε στην αναγνώριση περισσότερων από 300 διαφορεικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών στα SHR ζώα σε κάθε ηλικιακή ομάδα που μελετήσαμε. Από αυτές, η πρωτεΐνη SGLT2 βρέθηκε να έχει αυξημένη έκφραση στα υπερτασικά ζώα όλων των ηλικιών που μελετήθηκαν. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί συμμεταφορέα γλυκόζης και ιόντων  $\text{Na}^+$ . Όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 1.7 η SGLT2 παίζει σπουδαίο ρόλο στην λειτουργία του νεφρού και αποτελεί έναν από τους βασικούς στόχους των νέων αντιδιαβητικών φαρμάκων. Το γεγονός αυτό καθώς και τα ευρήματά μας από την πρωτεομική ανάλυση που δείχνουν ξεκάθαρη αύξηση του συμμεταφορέα στα υπερτασικά ζώα πολύ νωρίς στην ανάπτυξη σε συνδυασμό με την απουσία βιβλιογραφίας που να συνδέει άμεσα την SGLT2 με την υπερτασική νεφροσκλήρυνση μας οδήγησαν στο να την επιλέξουμε για περαιτέρω μελέτη και επιβεβαίωση των ευρημάτων της πρωτεομικής με ανεξάρτητες μεθόδους.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν μελέτες ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού σε FFPE νεφρικές τομές με ειδικό για την πρωτεΐνη SGLT2 αντίσωμα. Οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν σε νεφρικό ιστό από τα ίδια ζώα που χρησιμοποιήθηκαν για την πρωτεομική ανάλυση με LC-MS/MS. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ο συμμεταφορέας SGLT2 εντοπίζεται αποκλειστικά στην ψυκτροειδή παρυφή των επιθηλιακών κυττάρων των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων όπως αναμενόταν με βάση την βιβλιογραφία. Επιπλέον, εικόνες ανοσοφθορισμού από τυχαία πεδία του νεφρικού παρεγχύματος χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση του σήματος φθορισμού με την χρήση του προγράμματος Image J (Εικόνα 19c). Τα αποτελέσματα είναι σε πλήρη συμφωνία με την πρωτεομική ανάλυση και έδειξαν πως υπάρχει αύξηση της έκφρασής της στα υπερτασικά ζώα από την ηλικία των 6 εβδομάδων, δηλαδή πολύ νωρίς στην ανάπτυξη υπέρτασης στο μοντέλο SHR. Τα ευρήματα αυτά παρουσιάζονται στις Εικόνες 18, 19.

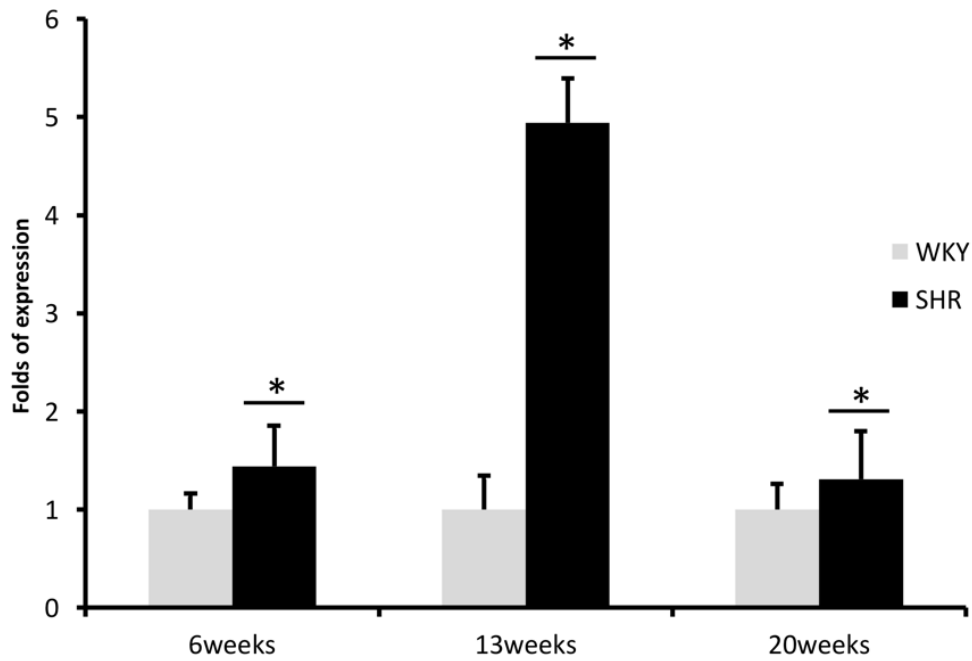


**Εικόνα 18:** *a)* Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοϊστοχημείας για την πρωτεΐνη SGLT2 στα υπέρτασικά SHR και νορμοτασικά WKY ζώα 6, 13 και 20 εβδομάδων. *b)* Μεγέθυνση του νεφρικού παρεγχύματος υπέρτασικού ζώου 20 εβδομάδων όπου φαίνεται η κατανομή του σήματος. Η αυξημένη έκφρασης της SGLT2 εντοπίζεται αποκλειστικά στην ψυκτροειδή παρυφή των επιθηλιακών κυττάρων των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων (μπλε βέλη).



**Εικόνα 19:** *a)* Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού για την πρωτεΐνη SGLT2 στα υπερτασικά SHR και νορμοτασικά WKY ζώα 6, 13 και 20 εβδομάδων. *b)* Μεγέθυνση του νεφρικού παρεγχύματος υπερτασικού ζώου 13 εβδομάδων όπου φαίνεται η κατανομή του σήματος φθορισμού. Η SGLT2 εκφράζεται αποκλειστικά στην ψυκτροειδή παρυφή των επιθηλιακών κυττάρων των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων. *c)* Ποσοτικοποίηση της έντασης και της κατανομής του σήματος φθορισμού για την πρωτεΐνη SGLT2 στο νεφρικό παρέγχυμα (\*  $p$ -value < 0.05).

Επόμενο βήμα στη μελέτη μας ήταν να ελέγξουμε την έκφραση του γονιδίου για την πρωτεΐνη SGLT2. Ο σκοπός ήταν να διευκρινίσουμε εάν οι παρατηρούμενες αλλαγές στην έκφραση της SGLT2 στα υπερτασικά ζώα οφείλονται στην αυξημένη έκφραση του γονιδίου ή σε αλλαγές που συμβαίνουν μετα-μεταφραστικά. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήσαμε RT-qPCR σε δείγματα RNA από τα ίδια ζώα που πραγματοποιήθηκε πρωτεομική ανάλυση και μετρήθηκε σε πραγματικό χρόνο η έκφραση του γονιδίου της SGLT2 με την βοήθεια ειδικών εκκινήτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπάρχει σημαντική αύξηση στην έκφραση του εν λόγω γονιδίου κυρίως στα υπερτασικά ζώα 13 εβδομάδων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα νορμοτασικά ζώα ίδιας ηλικίας. (Εικόνα 20)



*Εικόνα 20: Αποτελέσματα της RT-qPCR ανάλυσης για το γονίδιο της SGLT2. Υπάρχει σημαντική αύξηση στην έκφραση του γονιδίου στα υπέρτασικά ζώα 13 εβδομάδων.*

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

---

### 4.1 Γενικά

---

Η υπερτασική νεφροσκλήρυνση αποτελεί την δεύτερη αιτία, μετά τον διαβήτη, χρόνιας νεφρικής νόσου. Η πάθηση εξελίσσεται αθόρυβα σε ανεπάρκεια νεφρών και η διάγνωσή της είναι δύσκολη διότι δεν εμφανίζονται ειδικά συμπτώματα. Οι ασθενείς εκδηλώνουν συμπτώματα όταν σχεδόν το 50% της λειτουργίας των νεφρών έχει χαθεί. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν αξιόπιστοι βιοδείκτες για την έγκαιρη εκτίμηση της νεφρικής βλάβης. Επιπλέον, οι μηχανισμοί που ενοχοποιούνται για την ανάπτυξη και την πρόοδο της νεφρικής βλάβης, λόγω της υπέρτασης, παραμένουν αδιευκρίνιστοι.

Το αντικείμενο της παρούσας διατριβής αφορούσε τη μελέτη των επιπτώσεων της υπέρτασης στο συνολικό πρωτέωμα του νεφρού και την εύρεση πιθανών πρώιμων βιοδεικτών υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης σε ένα ευρέως γνωστό υπερτασικό μοντέλο, το Spontaneously Hypertensive Rat (SHR). Καθώς η λήψη βιοψιών από υπερτασικούς ασθενείς είναι μια επίπονη και εν πολλοίς μη ενδεικνύομενη διαδικασία το μοντέλο SHR αποτελεί την καλύτερη εναλλακτική λύση για τέτοιου είδους μελέτες. Απώτερος στόχος της μελέτης μας ήταν η αναγνώριση πιθανών βιοδεικτών, που θα μπορούσαν εύκολα να ανιχνευθούν σε βιολογικά υγρά υπερτασικών ασθενών όπως τα ούρα και τελικά να δημιουργηθούν πρακτικά και διαγνωστικά τεστ για την έγκαιρη και μη επεμβατική εκτίμηση της νεφρικής βλάβης.

Η καλύτερη προσέγγιση για την ανεύρεση τέτοιων μορίων-δεικτών σε πολυπαραγοντικές παθολογικές καταστάσεις, όπως η υπερτασική νεφροσκλήρυνση, είναι η βιολογία συστημάτων και ειδικότερα η πρωτεομική ανάλυση. Οι μέθοδοι πρωτεομικής που εφαρμόσαμε μας επέτρεψαν τη μελέτη του συνολικού πρωτεόματος των νεφρικών κυττάρων και τον εντοπισμό μεμονωμένων πρωτεϊνών που η έκφραση τους αλλάζει λόγω της υπέρτασης. Μεθοδολογικά, οι αναλύσεις μας ξεκίνησαν από δείγματα νεφρικού παρεγχύματος που περιέχουν πολλούς κυτταρικούς τύπους και μετά την ανάδειξη διαφορεικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών, σε όσες επιλέξαμε, αναζητήσαμε την μεταβολή της έκφρασής τους τόσο σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο όσο και σε υποκυτταρικό διαμέρισμα, με τη βοήθεια μορφολογικών τεχνικών. Ορισμένες από τις πρωτεΐνες αυτές έχουν πιθανό κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της πάθησης. Ο πρώτος στόχος ήταν να αναγνωρισθούν οι πρωτεΐνες του νεφρού που εμφανίζουν διαφορεική έκφραση στα υπερτασικά ζώα SHR σε σύγκριση με τα νορμοτασικά WKY. Για την υλοποίηση του συγκεκριμένου στόχου εφαρμόσαμε 2 διαφορετικές προσεγγίσεις πρωτεομικής ανάλυσης:



1) Μια πρώτη προσέγγιση με 2DE MALDI-MS σε υπερτασικά και νορμοτασικά ζώα και  
2) μια πιο ενδελεχή πρωτεομική ανάλυση με LC-MS/MS μεγαλύτερης ευαισθησίας στα ίδια ζώα. Ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων και για τις δύο μεθοδολογίες και επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων για κάποιες από τις πρωτεΐνες με ανεξάρτητες μεθόδους.

Όσον αφορά τη σύγκριση των δύο προσεγγίσεων πρωτεομικής ανάλυσης που εφαρμόσαμε, η 2η προσέγγιση (LC-MS/MS) είναι υψηλότερης ευαισθησίας καθώς αναγνωρίζονται περισσότερες πρωτεΐνες στα ίδια δείγματα σε σύγκριση με την 1<sup>η</sup>. Ωστόσο, η 1η μέθοδος (2DE-MALDI-MS) αν και αναγνωρίζει λιγότερες πρωτεΐνες, επιτρέπει την αναγνώριση πρωτεϊνών οι οποίες δεν αναγνωρίζονται στην ανάλυση LC-MS/MS. Η μέθοδος 2DE-MALDI-MS επιτρέπει την ανάλυση διαφορετικών ισομορφών της ίδιας πρωτεΐνης, μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων καθώς και πιθανών σημείων πρωτεόλυσης της πρωτεΐνης, ανάλογα με τη θέση των κηλίδων ως προς την κατεύθυνση του pI. Οι παραπάνω περιπτώσεις δεν είναι δυνατό να ανιχνευθούν με τη μέθοδο LC-MS/MS [67]. Επομένως, η κάθε μέθοδος έχει διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και οι δύο προσεγγίσεις πρωτεομικής που εφαρμόσαμε είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους.

Επιπλέον, μια τρίτη προσέγγιση πρωτεομικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε σε νεφρικά αγγεία υπερτασικών και νορμοτασικών ζώων. Γνωρίζοντας πως μια από τις σημαντικότερες επιπτώσεις της υπέρτασης είναι η βλάβη που προκαλεί στα αγγεία πραγματοποιήσαμε πρωτεομική ανάλυση με την τεχνική GeLC-MS/MS αποκλειστικά σε αγγεία που απομονώθηκαν με Laser Capture Microdissection.

Οι τρεις πειραματικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιήσαμε, επέτρεψαν την αναγνώριση πλήθους πρωτεϊνών, τόσο στο νεφρικό παρέγχυμα συνολικά όσο και στα νεφρικά αγγεία ειδικά, που παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση στα υπερτασικά ζώα σε σύγκριση με τα νορμοτασικά. Ορισμένες από τις πρωτεΐνες αυτές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες ή δυνητικά ακόμα και ως φαρμακευτικοί στόχοι. Επιπλέον, τα ευρήματά μας από την πρωτεομική ανάλυση μπορεί να αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω μελέτες.

## 4.2 Συζήτηση των αποτελεσμάτων 2DE MALDI-MS

---

Για την καλύτερη κατανόηση της υπερτασικής νεφροπάθειας σε μοριακό επίπεδο πραγματοποιήσαμε πρωτεομική ανάλυση του νεφρικού ιστού υπερτασικών SHR και νορμοτασικών WKY ζώων σε πολύ αρχικά στάδια ανάπτυξης με την τεχνική 2DE-MALDI MS. Ανιχνεύθηκε μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών με διαφορετική έκφραση καθώς και οι βιολογικές διεργασίες με τις οποίες σχετίζονται. Στη συνέχεια εστίασαμε σε μια από αυτές τις πρωτεΐνες, την CLIC4, και αποδείξαμε ότι τα δεδομένα της πρωτεομικής για την συγκεκριμένη πρωτεΐνη επιβεβαιώνονται τόσο με βιοχημική ανάλυση όσο και με μορφολογικές μελέτες ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού.

Τα ευρήματά μας ότι η έκφραση της CLIC4 αυξάνεται στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια υπερτασικών ζώων από την ηλικία των 6 εβδομάδων παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι εμφανίζονται πρώιμες μοριακές αλλαγές στο συγκεκριμένο διαμέρισμα του νεφρικού παρεγχύματος. Αν και η οργανική βλάβη στο μοντέλο SHR ξεκινάει από την ηλικία των 20 εβδομάδων όπως αποδεικνύεται από την ανάπτυξη υπερτροφίας της αριστερής κοιλίας, αορτικής δυσκαμψίας και πρωτεϊνουρίας, έως τώρα δεν ήταν γνωστό ότι συμβαίνουν μορφολογικές αλλαγές σε υπερτασικά ζώα ηλικίας μικρότερης των 30 εβδομάδων [28]. Στην ηλικία αυτή οι μορφολογικές αλλαγές εμφανίζονται με τη μορφή ατροφίας των σωληναρίων και την ενδιάμεση ίνωση. Επομένως, τα ευρήματά μας είναι σημαντικά για την κατανόηση της πηγής των παθοφυσιολογικών αλλαγών που συμβαίνουν στο νεφρό από την υπέρταση και είναι σε πλήρη συμφωνία με τα μέχρι τώρα δεδομένα που υποδεικνύουν τη σημασία των σωληναρίων στη νεφρική ανεπάρκεια, την υπέρταση και την οξεία νεφρική βλάβη [68,69].

Σε προηγούμενη μελέτη έχει δειχθεί πως τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια βασίζονται στον αερόβιο μεταβολισμό με τα μιτοχόνδρια των κυττάρων να βρίσκονται σε παρατεταμένη κατάσταση οξειδωσης [70]. Έτσι, έχει αποδειχθεί ότι τα σωληνάρια αυτά είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Από την βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων μας προέκυψε πως πράγματι υπάρχει σαφής συσχέτιση του οξειδωτικού στρες, της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και της παθοφυσιολογίας της υπέρτασης. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζονται και από προηγούμενες μελέτες στο μοντέλο SHR που δείχνουν την παρουσία και την σημασία του οξειδωτικού στρες στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης [71-75]. Επιπλέον, η ανάλυσή μας έδειξε πως η πρωτεΐνη CLIC4 είναι πιθανό να εμπλέκεται στα μονοπάτια που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Πίνακας 2).

Στο νεφρό η CLIC4 εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς σωληναρίων όπου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μεταφορά ουσιών, την δημιουργία του microvillus και την βιογένεση των λυσοσωμάτων. Η απουσία της σε CLIC4-null ποντίκια σχετίζεται με μειωμένη ανάπτυξη των σωληναρίων στα έμβρυα και με μη φυσιολογική διαστολή των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων στους ενήλικους ποντικούς ενώ έχει και σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση [37,76]. Τα εγγύς σωληνάκια ευθύνονται για την επαναρρόφηση των 2/3 του διηθημένου νερού των ιόντων νατρίου και χλωρίου. Σε αυτό το τμήμα του νεφρώνα η επαναρρόφηση του νατρίου ρυθμίζεται αυστηρά ανάλογα με τον ρυθμό της σπειραματικής διήθησης και εξαρτάται από την λειτουργία των διαμεμβρικών πρωτεϊνών όπως η αντλία  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  στην κορυφαία μεμβράνη. Έτσι, η υπερέκφραση της CLIC4 στα υπερτασικά ζώα στην κορυφαία μεμβράνη/ψηκτροειδή παρυφή των επιθηλιακών κυττάρων στα εγγύς σωληνάκια θα μπορούσε να οδηγήσει σε επιδείνωση της επαναρρόφησης των ιόντων χλωρίου, μειωμένη χορήγησή του στην πυκνή κηλίδα (macula densa) στα άπω σωληνάκια, μειωμένη σωληναριο-σπειραματική ανάδραση (tubuloglomerular feedback) και τελικά αυξημένη απελευθέρωση ρενίνης. Με βάση τα παραπάνω, τα ιόντα χλωρίου μαζί με τα ιόντα νατρίου είναι πιθανό να έχουν κρίσιμο ρόλο στη διαμεσολάβηση μηνυμάτων από τα σωληνάκια στην πυκνή κηλίδα επηρεάζοντας την σωληναριο-σπειραματική ανάδραση η οποία είναι γνωστό πως παίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του νεφρού [77,78]. Συνεπώς, είναι σημαντικό να μελετηθεί περαιτέρω ο ρόλος της CLIC4 στα κύτταρα των εγγύς σωληναρίων και να διερευνηθεί εις βάθος η παρατηρούμενη αύξηση στην έκφρασή της στα κύτταρα αυτά λόγω της υπέρτασης.

### 4.3 Συζήτηση των αποτελεσμάτων LC-MS/MS

---

Από τη μελέτη του νεφρικού παρεγχύματος υπερτασικών και νορμοτασικών ζώων με την τεχνική LC-MS/MS ανιχνεύθηκαν ποικίλοι πιθανοί στόχοι. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων μας έδωσε ένα μεγάλο αριθμό διαφορεικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών οι οποίες μπορεί να αποτελέσουν πιθανούς βιοδείκτες για την έγκαιρη ανίχνευση της νεφρικής βλάβης λόγω της υπέρτασης. Μια από αυτές τις πρωτεΐνες, ο συµμεταφορέας γλυκόζης και ιόντων νατρίου SGLT2, επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη με βάση τα στατιστικά κριτήρια, αλλά και την λειτουργία του στο νεφρό.

Στο μοντέλο SHR η σωληναριακή ατροφία καθίσταται σημαντική μεταξύ 30<sup>ης</sup> και 60<sup>ης</sup> εβδομάδας, ενώ η νεφρική βλάβη είναι μορφολογικά εμφανής σε ζώα ηλικίας άνω των 30 εβδομάδων [28]. Στη μελέτη μας εντοπίσαμε μοριακές αλλαγές που συμβαίνουν στα σωληνάκια των υπερτασικών ζώων από την ηλικία των 6 εβδομάδων. Δηλαδή οι μοριακές αλλαγές συμβαίνουν στα σωληνάκια πολύ πριν εκδηλωθούν μορφολογικές αλλοιώσεις στο νεφρικό παρέγχυμα. Τα ευρήματά μας ότι η έκφραση της πρωτεΐνης SGLT2 αυξάνεται στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς σωληναρίων πολύ νωρίς στην ανάπτυξη υποστηρίζονται και από τις παρατηρούμενες μοριακές αλλαγές στο ίδιο διαμέρισμα του νεφρικού παρεγχύματος υπερτασικών ζώων ίδιας ηλικίας κατά την πρώτη πρωτεομική ανάλυση που πραγματοποιήσαμε με 2 DE MALDI-MS. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι πρώιμες αλλαγές συμβαίνουν στο σωληναριακό διαμέρισμα του νεφρού και ότι οι αλλαγές αυτές είναι πιθανό να εμπλέκονται στην ανάπτυξη της νεφρικής βλάβης λόγω της υπέρτασης. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει την σημασία των σωληναρίων στην ανθρώπινη νεφρική ανεπάρκεια και την οξεία νεφρική βλάβη [68]. Ωστόσο, μέχρι τώρα δεν έχουν καταγραφεί πρώιμες μοριακές μεταβολές στα κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων και μάλιστα πριν την εγκαθίδρυση οποιασδήποτε νεφρικής βλάβης.

Η πιθανή συμμετοχή του SGLT2 στην παθοφυσιολογία της υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης, αλλά και το ενδεχόμενο να αποτελέσει στο μέλλον έναν πρώιμο βιοδείκτη της νεφρικής βλάβης υποστηρίζεται από τη θέση και την λειτουργία του στο νεφρικό παρέγχυμα. Ο SGLT2 είναι ο κύριος συµμεταφορέας της επαναπορρόφησης της γλυκόζης στο νεφρό και εντοπίζεται αποκλειστικά στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων των εγγύς σωληναρίων που είναι γνωστή ως ψηκτροειδής παρυφή [79]. Ο εντοπισμός και η υπερέκφραση του SGLT2 στην ψηκτροειδή παρυφή αυξάνει την πιθανότητα ότι το μόριο αυτό μπορεί σε παθολογικές καταστάσεις να εκκρίνεται στα ούρα

μέσω εξωσωμάτων [80]. Η ανίχνευση του SGLT2 στα δείγματα ούρων υπερτασικών ασθενών θα έχει μεγάλη σημασία για τον σχεδιασμό μη επεμβατικών προσεγγίσεων με σκοπό την διάγνωση και την θεραπεία της υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης.

Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μια νέα κατηγορία φαρμάκων (Empagliflozin, Canagliflozin, Dapagliflozin, Ertugliflozin) για τη μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα διαβητικών ασθενών. Τα φάρμακα αυτά δρουν αναστέλλοντας τη νεφρική επαναρρόφηση της γλυκόζης με μηχανισμό ανεξάρτητο από την ινσουλίνη [38]. Ειδικότερα, ο μηχανισμός δράσης τους περιλαμβάνει την αναστολή της λειτουργίας του συμμεταφορέα SGLT2 με αποτέλεσμα να αυξάνεται η αποβολή γλυκόζης στα ούρα (γλυκοζουρία) και να μειώνεται η υπεργλυκαιμία στους διαβητικούς ασθενείς ανεξάρτητα από την λειτουργία της ινσουλίνης. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν τα μακροπρόθεσμα καρδιαγγειακά και νεφρικά οφέλη των αναστολέων του SGLT2 καθώς και ευνοϊκές επιδράσεις στην αρτηριακή πίεση, τα επίπεδα ουρικού οξέος, την ενδονεφρική αιμοδυναμική και την αλβουμινουρία [39,40]. Επιπλέον, έχει δειχθεί πως η αναστολή του SGLT2 έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της πρωτεϊνουρίας και της φλεγμονής στο νεφρό [41,42]. Τα ευρήματα αυτά συνδέονται με σημαντική μείωση της συστολικής αρτηριακής πίεσης και συμβαίνουν παρά την διέγερση του ενδονεφρικού συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης [43].

Επομένως, όπως υποδεικνύεται και από την σχετική βιβλιογραφία η αναστολή της δράσης του SGLT2 έχει σημαντικά οφέλη στην μείωση της αρτηριακής πίεσης. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει την υπόθεση ότι ο SGLT2 είναι πιθανό να εμπλέκεται στην ανάπτυξη της υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης στο νεφρό και να αποτελέσει στο μέλλον έναν αξιόπιστο δείκτη για την έγκαιρη εκτίμηση της νεφρικής βλάβης και έναν πιθανό στόχο για τη μείωση όχι μόνο της γλυκόζης στο αίμα διαβητικών αλλά και της αρτηριακής πίεσης υπερτασικών ασθενών .

#### 4.4 Συζήτηση των αποτελεσμάτων Laser Capture Microdissection και GeLC-MS/MS

Η πρωτεομική ανάλυση αποκλειστικά στα νεφρικά αγγεία υπερτασικών και νορμοτασικών ζώων αποσκοπούσε στον εντοπισμό πρόωρων αλλαγών στο συγκεκριμένο διαμέρισμα του νεφρικού παρεγχύματος λόγω της υπέρτασης. Το πρωτόκολλο που εφαρμόσαμε περιλάμβανε δύο πολύ εξειδικευμένες τεχνικές: i) την τεχνική LCM (Laser Capture Microdissection) για την απομόνωση των αγγείων με εξαιρετική ακρίβεια και ii) την πρωτεομική τεχνική υψηλής ευαισθησίας GeLC-MS/MS για τη μελέτη του συνολικού πρωτεόματος των νεφρικών αγγείων σε δείγματα με ελάχιστη ποσότητα πρωτεΐνης.

Η χρήση της τεχνικής LCM σε μελέτες που αφορούν το νεφρό παρέχει ένα σημαντικό πλεονέκτημα. Μας δίνει την δυνατότητα να διαχωρίσουμε διαφορετικά διαμερίσματα και υπο-διαμερίσματα του νεφρικού παρεγχύματος χωρίς καμία πρόσμιξη. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται μέχρι τώρα για το σκοπό αυτό (π.χ. χρήση διαφορετικών τύπων κόσκινων για τον διαχωρισμό των σπειραμάτων από τα σωληνάρια) έχουν το μειονέκτημα ότι δεν μπορούν να διαχωρίσουν τους διαφορετικούς τύπους σωληναρίων μεταξύ τους (π.χ. εγγύς και άπω σωληνάρια). Επιπλέον, αυτές οι μεθοδολογίες είναι δαπανηρές. Τα δείγματα που απομονώνονται με την τεχνική LCM μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε για πρωτεομική ανάλυση είτε για την σε βάθος ανάλυση του μεταγραφώματος των διαφορετικών τύπων κυττάρων που απαρτίζουν το νεφρό. Συνεπώς, η χρήση τέτοιων δειγμάτων σε μελλοντικές μελέτες θα οδηγήσει σε μια πιο εις βάθος κατανόηση της παθοφυσιολογίας του νεφρού.

Στη μελέτη μας ο μεγάλος αριθμός των αναγνωρισμένων πρωτεϊνών επιβεβαιώνει ότι ο συνδυασμός των δύο μεθόδων ήταν εξαιρετικά αποτελεσματικός και ικανός για την αναγνώριση πρωτεϊνών με διαφορετική έκφραση στα αγγεία που πιθανόν να εμπλέκονται στην παθογένεια της υπέρτασης. Επιπλέον, η σύγκριση των δεδομένων που προέκυψαν από την ανάλυσή μας με την διαθέσιμη βάση δεδομένων Rat IMCD proteome database έδειξε πώς 517 πρωτεΐνες από τις συνολικά 688 που αναγνωρίστηκαν στα νεφρικά αγγεία ήταν κοινές με την παραπάνω βάση δεδομένων. Με άλλα λόγια υπάρχει σχεδόν 75% αλληλοεπικάλυψη των αποτελεσμάτων μας με την βάση δεδομένων Rat IMCD γεγονός που ενισχύει την αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας που εφαρμόσαμε.

Είναι ευρέως γνωστό πως η υπέρταση προκαλεί βλάβες στα τοιχώματα των αγγείων. Στα υπερτασικά άτομα η ενδοθηλιακή λειτουργία εμφανίζεται εξασθενημένη στα διάφορα αγγειακά διαμερίσματα συμπεριλαμβανομένων των νεφρικών αρτηριών και των διακλαδώσεών τους. Οι μεταβολές στο αγγειακό τοίχωμα μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεση της υπέρτασης σε πρώιμο στάδιο, ενώ παράλληλα μπορεί να θεωρηθούν ως

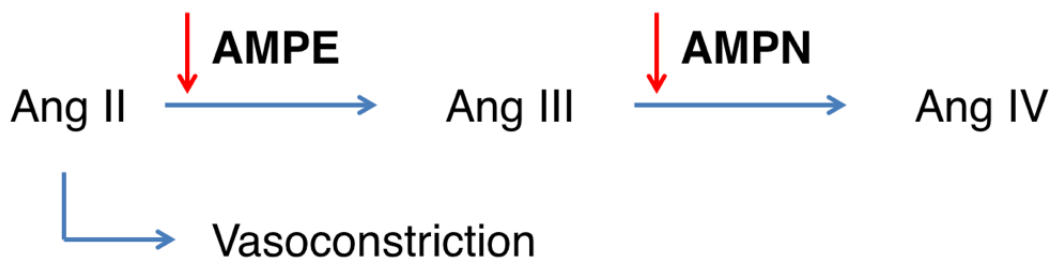
συνέπεια της υπέρτασης σε ένα μεταγενέστερο στάδιο [28]. Το αν η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία αποτελεί αιτία ή συνέπεια της υπέρτασης έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών [81]. Οι μηχανισμοί που οδηγούν σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μπορεί να σχετίζονται με μείωση των παραγόντων EDRFs (endothelium-derived relaxing factors) ή/και με την αύξηση των παραγόντων EDCFs (endothelium-derived constricting factors).

Στο μοντέλο SHR, μεταβολές στην αγγειακή δομή και σε λειτουργίες που σχετίζονται με την υπέρταση δεν εμφανίζονται σε νεαρά ζώα, αλλά παρατηρούνται σε ενήλικα ζώα ηλικίας άνω των 25 εβδομάδων [82]. Η μελέτη μας, εστιάζοντας σε ένα πρώιμο χρονικό διάστημα, παρέχει βάσιμα στοιχεία ότι στο μοντέλο SHR συμβαίνουν πρώιμες μοριακές μεταβολές στα νεφρικά αγγεία από την ηλικία των 20 εβδομάδων. Από την ανάλυσή μας προέκυψαν 58 πρωτεΐνες διαφορεικά εκφραζόμενες στα υπερτασικά SHR ζώα, οι οποίες σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την αγγειακή δυσλειτουργία.

Πολλές από τις διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που προσδιορίστηκαν σχετίζονται με τη ρύθμιση του αγγειακού τόνου. Έτσι, αναγνωρίστηκαν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην λειτουργία του NO (νιτρικό οξείδιο) ως αγγειοδιασταλτικού παράγοντα και οι οποίες επηρεάζουν την ενδοθηλιακή συνθετάση του νιτρικού οξειδίου eNOS. Οι πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνουν τις Xaa-Pro aminopeptidase 1 (XPP1), N(G) N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1), Dehydropteridine reductase (DHPR). Επιπλέον, αναγνωρίστηκαν και πρωτεΐνες με διαφορεική έκφραση που επηρεάζουν την αγγειοσυστολή και την ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης από το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης [83]. Οι πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνουν τις Glutamyl aminopeptidase/Aminopeptidase A (AMPE) και Aminopeptidase N (AMPN). Όλες αυτές οι πρωτεΐνες είναι πιθανό να εμπλέκονται στην παθογένεση της υπερτασικής νεφροπάθειας.

Ο μεταβολισμός της αγγειοτενσίνης είναι κρίσιμος για τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, καθώς εκτός από την αγγειοτενσίνη II (Ang II), τα πεπτιδικά θραύσματα που προέρχονται από αυτήν (Ang III και Ang IV) έχουν επίσης ποικίλους και σημαντικούς ρόλους. Το θραύσμα Ang III έχει δειχθεί πως είναι ένα δραστικό πεπτίδιο. Στο ενδονεφρικό σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης το Ang III αυξάνει τα επίπεδα του αγγειοτενσινογόνου καθώς και επάγει την έκφραση των γονιδίων των TGF- $\beta$ , fibronectin και monocyte chemoattractant protein-1. Επίσης, έχει αναφερθεί πως ο σχηματισμός του Ang III παίζει ρόλο στην μεσολαβούμενη από τον υποδοχέα AT2 νατριούρηση που παρατηρείται σε αρουραίους, μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για τη μείωση της αρτηριακής πίεσης. Επιπλέον, ο ενδοθηλιακός μεταβολισμός της Ang II στο πεπτίδιο Ang

III ενισχύει την διαστολή των αρτηριών της φλοιώδους μοίρας των επινεφριδίων [84]. Στην ανάλυσή μας στα νεφρικά αγγεία των υπερτασικών ζώων οι AMPE και AMPN που είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό των Ang III και Ang IV αντίστοιχα, βρέθηκαν μειωμένες (Εικόνα 21). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η Ang II να μην διασπάται σε Ang III και Ang IV [60,61], γεγονός που είναι πιθανό να ενισχύει την αγγειοσυσταλτική της δράση, ενώ παράλληλα μειώνεται η επαγόμενη από το Ang III απέκκριση νατρίου [85]. Οι αλλαγές αυτές είναι πιθανό να επάγουν την υπέρταση και είναι σε πλήρη συμφωνία με την αυξημένη αρτηριακή πίεση (160-170 mmHg) που μετρήθηκε στα υπερτασικά ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.



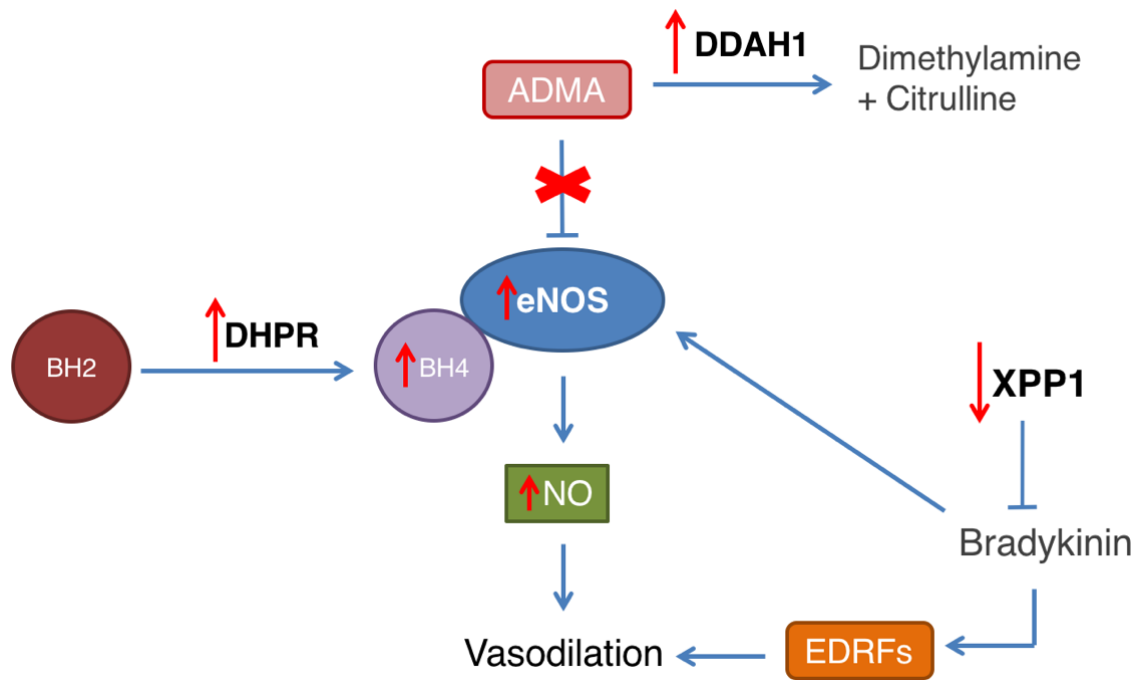
**Εικόνα 21:** Πιθανός μηχανισμός ενεργοποίησης της παρατεταμένης αγγειοσυσταλτικής δράσης της αγγειοτενσίνης II (Ang II). Η μειωμένη έκφραση των αμινοπεπτιδασών AMPE και AMPN στα υπερτασικά ζώα οδηγούν σε μειωμένη αποδόμηση της Ang II και Ang III αντίστοιχα ενισχύοντας την δράση της Ang II στα αγγεία.

Παρ' όλα αυτά, παρά την καθιερωμένη υψηλή αρτηριακή πίεση στα ζώα όπου έγινε η μελέτη, η ανάλυσή μας αποκάλυψε και διαφορετικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που μπορεί να έχουν προστατευτικό ρόλο κατά την ανάπτυξη υπέρτασης. Με άλλα λόγια, είναι πολύ πιθανό να ενεργοποιούνται αμυντικοί μηχανισμοί στα νεφρικά αγγεία των SHR ζώων σε πρώιμη φάση ανάπτυξης της υπέρτασης, για να εξισορροπήσουν ενδεχομένως την αγγειοσυσταλτική δράση της Ang II και άλλων παραγόντων με παρόμοια δράση. Σε προηγούμενες μελέτες έχει δειχθεί ο ρόλος του NO στην υπέρταση και την νεφρική βλάβη στο μοντέλο SHR και έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα της iNOS μόνο στα υπερτασικά ζώα και όχι στα νορμοτασικά WKY [86,87]. Στη μελέτη μας αναγνωρίστηκαν μόρια τα οποία μπορούν να επηρεάσουν την σύνθεση παραγόντων χαλάρωσης που προέρχονται από το ενδοθήλιο (EDRFs) αυξάνοντας τα επίπεδα του NO με αποτέλεσμα την διαστολή των



αγγείων. Συγκεκριμένα, η XPP1 η οποία διασπά την βραδυκινίνη βρέθηκε μειωμένη στα υπερτασικά ζώα οδηγώντας έτσι σε μειωμένη αποδόμηση της βραδικυκλίνης. Η βραδυκινίνη διεγείρει τα ενδοθηλιακά κύτταρα να παράγουν και να απελευθερώνουν EDRFs που προκαλούν διαστολή των αιμοφόρων αγγείων. Συνεπώς, η μειωμένη αποδόμηση της βραδυκινίνης πιθανότατα οδηγεί στην συνεχόμενη διέγερση των ενδοθηλιακών κυττάρων και στην απελευθέρωση EDRFs από αυτά με τελικό αποτέλεσμα τη διαστολή των αγγείων και τη μείωση της αρτηριακής πίεσης [57,58].

Άλλα μόρια που αναγνωρίστηκαν και παρουσιάζουν πιθανό προστατευτικό ρόλο είναι τα DDAH1 και DHPR. Το DDAH 1 είναι ένα ένζυμο που μεταβολίζει τη μεθυλαργινίνη και μειώνει τα επίπεδα της ασύμμετρης διμεθυλαργινίνης (ADMA). Η ADMA είναι μια ενδογενής ένωση που προέρχεται από την πρωτεόλυση πρωτεϊνών που περιέχουν μεθυλιωμένα υπολείμματα αργινίνης και αναστέλλει την καταλυτική δράση της συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου (NOS). Επιπλέον, έχει δειχθεί πως η ADMA συσσωρεύεται στο πλάσμα ασθενών με CKD [88] ενώ η μειωμένη σύνθεση της ADMA στα νεφρικά σωληνάρια προστατεύει από την προοδευτική μείωση της λειτουργίας των νεφρών [89]. Το DHPR είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αναγέννηση της τετραϋδροβιοπτερίνης (BH4). Το BH4 λειτουργεί ως συμπαραγοντας πολλών ενζύμων συμπεριλαμβανομένου και της συνθετάσης του NO (NOS) το οποίο έχει αντιφλεγμονώδη δράση [90]. Το DHPR μετατρέπει το BH2 σε BH4 το οποίο είναι απαραίτητο για παραγωγή NO από την NOS. Εάν το BH4 είναι ανεπαρκές στα κύτταρα, η NOS παράγει υπεροξείδιο [91,92]. Επομένως, η αυξημένη έκφραση του DHPR στο μοντέλο SHR πιθανότατα ευνοεί την αναγέννηση του BH4 επιτρέποντας την ενζυματική σύνθεση του NO. Γραφική απεικόνιση όλων αυτών των μορίων και του πιθανού μηχανισμού που οδηγεί σε διαστολή των αγγείων μέσω της παραγωγής NO και EDRFs παρουσιάζεται στην Εικόνα 22.



**Εικόνα 22:** Υποθετικός μηχανισμός που οδηγεί στην διαστολή των αγγείων στο μοντέλο SHR μέσω της παραγωγής NO και EDRFs. ADMA: asymmetric dimethylarginine, BH2: dihydrobiopterin, BH4: tetrahydrobiopterin, DDAH1: dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1, DHPR: dehydropteridine reductase, EDRFs: endothelium-derived relaxing factors, eNOS: endothelial nitric oxide synthase, NO: nitric oxide, XPP1: Xaa-Pro aminopeptidase 1.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

---

Η σχέση που συνδέει την έκταση της νεφρικής βλάβης ανεξαρτήτως αιτίας, με την έκπτωση της λειτουργικότητας του νεφρού δεν είναι απολύτως γραμμική. Ο νεφρός έχει την ικανότητα να συνεχίζει να λειτουργεί φυσιολογικά μέχρι ένα σημείο όσο η βλάβη σε αυτόν μπορεί να επεκτείνεται. Αυτό έχει ως συνέπεια τα συμπτώματα να εμφανίζονται όταν η βλάβη είναι αρκετά εκτεταμένη και πιθανότατα μη αναστρέψιμη. Το ίδιο συμβαίνει όταν αιτία της νεφρικής βλάβης αποτελεί η υπέρταση. Το γεγονός αυτό κάνει επιτακτική την ανάγκη να βρεθούν μόρια δείκτες που θα υποδηλώνουν την απαρχή της βλάβης που προκαλεί η υπέρταση στο νεφρικό παρέγχυμα με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση της υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης. Η παρούσα μελέτη συνέβαλε προς αυτήν την κατεύθυνση.

Τα ευρήματά μας στο σύνολο δύναται να αποτελέσουν πηγή πληροφοριών για περαιτέρω προσεγγίσεις και αναλύσεις στο νεφρό με τη βοήθεια της βιολογίας των συστημάτων. Δεδομένου ότι οι μηχανισμοί που οδηγούν σε υπερτασική νεφροσκλήρυνση δεν έχουν διευκρινιστεί λεπτομερώς, η μελέτη μας παρέχει εκτεταμένα δεδομένα πρωτεομικής σε πολύ πρώιμο στάδιο της πάθησης τα οποία μπορούν να θεωρηθούν ως σημείο εκκίνησης για μελλοντικές μελέτες σχετικά με την επίδραση της υπέρτασης στο νεφρικό παρέγχυμα και για την καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της.

Η εφαρμογή των τριών προσεγγίσεων πρωτεομικής ανάλυσης (2DE-MALDI-MS, LC-MS/MS και GeLC-MS/MS) επέτρεψε την διερεύνηση εις βάθος του νεφρικού πρωτεόματος συνολικά αλλά και του πρωτεόματος των αγγείων ειδικά, στο υπερτασικό μοντέλο SHR. Αναγνωρίστηκε πλήθος πρωτεϊνών με διαφορετική έκφραση. Δύο πρωτεΐνες με σημαντικό βιολογικό ρόλο, η CLIC4 και η SGLT2 επιβεβαιώθηκαν και με ανεξάρτητες μεθόδους όπως η ανοσοαποτύπωση κατά Western, η RT-qPCR, η ανοσοϊστοχημεία και ο ανοσοφθορισμός, και προτείνονται ως πιθανοί βιοδείκτες υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης στο μοντέλο SHR.

Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι σημαντικές αλλαγές συμβαίνουν στο νεφρικό παρέγχυμα από τα πρώτα στάδια ανάπτυξης της υπέρτασης στο πειραματικό μοντέλο SHR. Ειδικότερα, οι αλλαγές αυτές εντοπίζονται στο σωληναριακό διαμέρισμα του νεφρικού παρεγχύματος των υπερτασικών επίμυων, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι αλλαγές αυτές είναι πολύ ειδικά εντοπισμένες. Σύμφωνα με τη μέχρι τώρα βιβλιογραφία η βλάβη που προκαλείται από την παρατεταμένη υπέρταση εμφανίζεται πρώτα στα αγγεία και προϋπάρχει της βλάβης που εμφανίζεται στα σπειράματα [30]. Οι μηχανισμοί εξέλιξης

της αγγειακής βλάβης σε πειραματική και σωληναριακή βλάβη παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Επιπλέον, αν και δεν έχουν ταυτοποιηθεί αξιόπιστοι πρόωμοι δείκτες για την έγκαιρη διάγνωση και την εκτίμηση της νεφρικής βλάβης που προκαλεί η υπέρταση, τα μέχρι τώρα ευρήματά μας στο υπερτασικό μοντέλο SHR αποτελούν τις πρώτες βάσιμες ενδείξεις ότι οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να εξελιχθούν σε πιθανούς μελλοντικούς δείκτες. Στη μελέτη μας, η υπερέκφραση τόσο της πρωτεΐνης CLIC4 όσο και της πρωτεΐνης SGLT2 εντοπίζεται αποκλειστικά στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια, μια περιοχή του νεφρικού παρεγχύματος που δεν έχει συνδεθεί έως τώρα με τις άμεσες βλάβες της υπέρτασης στο νεφρό. Τα ευρήματά μας είναι πολύ σημαντικά καθώς υποδεικνύουν αλλαγές στην έκφραση πρωτεϊνών στο νεφρό πολύ νωρίς στην ανάπτυξη υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης, πριν εγκαθιδρυθεί η υπέρταση. Επομένως, οι πρωτεΐνες CLIC4 και SGLT2 πιθανότατα έχουν κρίσιμο ρόλο στην παθοφυσιολογία και την ανάπτυξη υπέρτασης στο μοντέλο SHR.

Μελλοντικά, η ανίχνευσή τους σε κατάλληλο βιολογικό υλικό από υπερτασικούς ασθενείς (π.χ ούρα) αλλά και από φυσιολογικά άτομα είναι απαραίτητη, για την επιβεβαίωση των ευρημάτων από το πειραματικό μοντέλο και στην ανθρώπινη υπέρταση.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. Inker, L.A.; Astor, B.C.; Fox, C.H.; Isakova, T.; Lash, J.P.; Peralta, C.A.; Kurella Tamura, M.; Feldman, H.I. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **2014**, *63*, 713-735, doi:10.1053/j.ajkd.2014.01.416.
2. Levey, A.S.; Becker, C.; Inker, L.A. Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review. *Jama* **2015**, *313*, 837-846, doi:10.1001/jama.2015.0602.
3. Cirillo, M. Evaluation of glomerular filtration rate and of albuminuria/proteinuria. *Journal of nephrology* **2010**, *23*, 125-132.
4. Vaidya, S.R.; Aeddula, N.R. Chronic Renal Failure. In *StatPearls*, Treasure Island (FL), 2019.
5. Tedla, F.M.; Brar, A.; Browne, R.; Brown, C. Hypertension in chronic kidney disease: navigating the evidence. *International journal of hypertension* **2011**, *2011*, 132405, doi:10.4061/2011/132405.
6. Andrassy, K.M. Comments on 'KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease'. *Kidney international* **2013**, *84*, 622-623, doi:10.1038/ki.2013.243.
7. Webster, A.C.; Nagler, E.V.; Morton, R.L.; Masson, P. Chronic Kidney Disease. *Lancet* **2017**, *389*, 1238-1252, doi:10.1016/S0140-6736(16)32064-5.
8. Roger, V.L.; Go, A.S.; Lloyd-Jones, D.M.; Benjamin, E.J.; Berry, J.D.; Borden, W.B.; Bravata, D.M.; Dai, S.; Ford, E.S.; Fox, C.S., et al. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **2012**, *125*, e2-e220, doi:10.1161/CIR.0b013e31823ac046.
9. Go, A.S.; Mozaffarian, D.; Roger, V.L.; Benjamin, E.J.; Berry, J.D.; Borden, W.B.; Bravata, D.M.; Dai, S.; Ford, E.S.; Fox, C.S., et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **2013**, *127*, e6-e245, doi:10.1161/CIR.0b013e31828124ad.
10. Go, A.S.; Mozaffarian, D.; Roger, V.L.; Benjamin, E.J.; Berry, J.D.; Blaha, M.J.; Dai, S.; Ford, E.S.; Fox, C.S.; Franco, S., et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **2014**, *129*, e28-e292, doi:10.1161/01.cir.0000441139.02102.80.

11. De Venecia, T.; Lu, M.; Figueredo, V.M. Hypertension in young adults. *Postgraduate medicine* **2016**, *128*, 201-207, doi:10.1080/00325481.2016.1147927.
12. Yu, X.Q.; Wu, L.L.; Huang, X.R.; Yang, N.; Gilbert, R.E.; Cooper, M.E.; Johnson, R.J.; Lai, K.N.; Lan, H.Y. Osteopontin expression in progressive renal injury in remnant kidney: role of angiotensin II. *Kidney international* **2000**, *58*, 1469-1480, doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00309.x.
13. Lloyd, C.; Gutierrez-Ramos, J.C. The role of chemokines in tissue inflammation and autoimmunity in renal diseases. *Current opinion in nephrology and hypertension* **1998**, *7*, 281-287.
14. Chen, X.L.; Tummala, P.E.; Olbrych, M.T.; Alexander, R.W.; Medford, R.M. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circulation research* **1998**, *83*, 952-959.
15. Shulman, N.B.; Ford, C.E.; Hall, W.D.; Blaufox, M.D.; Simon, D.; Langford, H.G.; Schneider, K.A. Prognostic value of serum creatinine and effect of treatment of hypertension on renal function. Results from the hypertension detection and follow-up program. The Hypertension Detection and Follow-up Program Cooperative Group. *Hypertension* **1989**, *13*, 180-93.
16. Klag, M.J.; Whelton, P.K.; Randall, B.L.; Neaton, J.D.; Brancati, F.L.; Ford, C.E.; Shulman, N.B.; Stamler, J. Blood pressure and end-stage renal disease in men. *The New England journal of medicine* **1996**, *334*, 13-18, doi:10.1056/NEJM199601043340103.
17. Tozawa, M.; Iseki, K.; Iseki, C.; Kinjo, K.; Ikemiya, Y.; Takishita, S. Blood pressure predicts risk of developing end-stage renal disease in men and women. *Hypertension* **2003**, *41*, 1341-1345, doi:10.1161/01.HYP.0000069699.92349.8C.
18. Hill, G.S. Hypertensive nephrosclerosis. *Current opinion in nephrology and hypertension* **2008**, *17*, 266-270, doi:10.1097/MNH.0b013e3282f88a1f.
19. Doggrell, S.A.; Brown, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular research* **1998**, *39*, 89-105, doi:10.1016/s0008-6363(98)00076-5.
20. Lin, H.Y.; Lee, Y.T.; Chan, Y.W.; Tse, G. Animal models for the study of primary and secondary hypertension in humans. *Biomedical reports* **2016**, *5*, 653-659, doi:10.3892/br.2016.784.
21. Wiesel, P.; Mazzolai, L.; Nussberger, J.; Pedrazzini, T. Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice. *Hypertension* **1997**, *29*, 1025-1030.

22. Zeng, J.; Zhang, Y.; Mo, J.; Su, Z.; Huang, R. Two-kidney, two clip renovascular hypertensive rats can be used as stroke-prone rats. *Stroke* **1998**, *29*, 1708-1713; discussion 1713-1704.
23. Kuijpers, M.H.; Gruys, E. Spontaneous hypertension and hypertensive renal disease in the fawn-hooded rat. *British journal of experimental pathology* **1984**, *65*, 181-190.
24. Dobrian, A.D.; Davies, M.J.; Prewitt, R.L.; Lauterio, T.J. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension* **2000**, *35*, 1009-1015.
25. Rapp, J.P.; Dene, H. Development and characteristics of inbred strains of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Hypertension* **1985**, *7*, 340-349.
26. Okamoto, K.; Aoki, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese circulation journal* **1963**, *27*, 282-293.
27. Yagil, Y.; Yagil, C. Genomic research in rat models of kidney disease. *Methods in molecular biology* **2010**, *597*, 427-444, doi:10.1007/978-1-60327-389-3\_29.
28. Hultstrom, M. Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension* **2012**, *30*, 1087-1091, doi:10.1097/HJH.0b013e328352b89a.
29. Lee, K.M.; Kang, H.A.; Ko, C.B.; Oh, E.H.; Park, M.; Lee, H.Y.; Choi, H.R.; Yun, C.H.; Jung, W.W.; Oh, J.W., et al. Differential gene expression profiles in spontaneously hypertensive rats induced by administration of enalapril and nifedipine. *International journal of molecular medicine* **2013**, *31*, 179-187, doi:10.3892/ijmm.2012.1183.
30. Ochodnický, P.; Henning, R.H.; Buikema, H.J.; de Zeeuw, D.; Provoost, A.P.; van Dokkum, R.P. Renal vascular dysfunction precedes the development of renal damage in the hypertensive Fawn-Hooded rat. *American journal of physiology. Renal physiology* **2010**, *298*, F625-633, doi:10.1152/ajprenal.00289.2009.
31. He, J.C.; Chuang, P.Y.; Ma'ayan, A.; Iyengar, R. Systems biology of kidney diseases. *Kidney international* **2012**, *81*, 22-39, doi:10.1038/ki.2011.314.
32. Hoorn, E.J.; Pisitkun, T.; Zietse, R.; Gross, P.; Frokiaer, J.; Wang, N.S.; Gonzales, P.A.; Star, R.A.; Knepper, M.A. Prospects for urinary proteomics: exosomes as a source of urinary biomarkers. *Nephrology* **2005**, *10*, 283-290, doi:10.1111/j.1440-1797.2005.00387.x.

33. Thippakorn, C.; Schaduangrat, N.; Nantasenamat, C. Proteomic and bioinformatic discovery of biomarkers for diabetic nephropathy. *EXCLI journal* **2018**, *17*, 312-330, doi:10.17179/excli2018-1150.
34. Klein, J.; Kavvadas, P.; Prakoura, N.; Karagianni, F.; Schanstra, J.P.; Bascands, J.L.; Charonis, A. Renal fibrosis: insight from proteomics in animal models and human disease. *Proteomics* **2011**, *11*, 805-815, doi:10.1002/pmic.201000380.
35. Littler, D.R.; Harrop, S.J.; Goodchild, S.C.; Phang, J.M.; Mynott, A.V.; Jiang, L.; Valenzuela, S.M.; Mazzanti, M.; Brown, L.J.; Breit, S.N., et al. The enigma of the CLIC proteins: Ion channels, redox proteins, enzymes, scaffolding proteins? *FEBS letters* **2010**, *584*, 2093-2101, doi:10.1016/j.febslet.2010.01.027.
36. Suginta, W.; Karoulias, N.; Aitken, A.; Ashley, R.H. Chloride intracellular channel protein CLIC4 (p64H1) binds directly to brain dynamin I in a complex containing actin, tubulin and 14-3-3 isoforms. *The Biochemical journal* **2001**, *359*, 55-64, doi:10.1042/0264-6021:3590055.
37. Chou, S.Y.; Hsu, K.S.; Otsu, W.; Hsu, Y.C.; Luo, Y.C.; Yeh, C.; Shehab, S.S.; Chen, J.; Shieh, V.; He, G.A., et al. CLIC4 regulates apical exocytosis and renal tube luminogenesis through retromer- and actin-mediated endocytic trafficking. *Nature communications* **2016**, *7*, 10412, doi:10.1038/ncomms10412.
38. Chao, E.C.; Henry, R.R. SGLT2 inhibition--a novel strategy for diabetes treatment. *Nature reviews. Drug discovery* **2010**, *9*, 551-559, doi:10.1038/nrd3180.
39. Neal, B.; Perkovic, V.; Mahaffey, K.W.; de Zeeuw, D.; Fulcher, G.; Erondou, N.; Shaw, W.; Law, G.; Desai, M.; Matthews, D.R., et al. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine* **2017**, *377*, 644-657, doi:10.1056/NEJMoa1611925.
40. Mahaffey, K.W.; Neal, B.; Perkovic, V.; de Zeeuw, D.; Fulcher, G.; Erondou, N.; Shaw, W.; Fabbrini, E.; Sun, T.; Li, Q., et al. Canagliflozin for Primary and Secondary Prevention of Cardiovascular Events: Results From the CANVAS Program (Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study). *Circulation* **2018**, *137*, 323-334, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032038.
41. Terami, N.; Ogawa, D.; Tachibana, H.; Hatanaka, T.; Wada, J.; Nakatsuka, A.; Eguchi, J.; Horiguchi, C.S.; Nishii, N.; Yamada, H., et al. Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice. *PloS one* **2014**, *9*, e100777, doi:10.1371/journal.pone.0100777.



42. Vallon, V.; Gerasimova, M.; Rose, M.A.; Masuda, T.; Satriano, J.; Mayoux, E.; Koepsell, H.; Thomson, S.C.; Rieg, T. SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces renal growth and albuminuria in proportion to hyperglycemia and prevents glomerular hyperfiltration in diabetic Akita mice. *American journal of physiology. Renal physiology* **2014**, *306*, F194-204, doi:10.1152/ajprenal.00520.2013.
43. Wang, X.X.; Levi, J.; Luo, Y.; Myakala, K.; Herman-Edelstein, M.; Qiu, L.; Wang, D.; Peng, Y.; Grenz, A.; Lucia, S., et al. SGLT2 Protein Expression Is Increased in Human Diabetic Nephropathy: SGLT2 PROTEIN INHIBITION DECREASES RENAL LIPID ACCUMULATION, INFLAMMATION, AND THE DEVELOPMENT OF NEPHROPATHY IN DIABETIC MICE. *The Journal of biological chemistry* **2017**, *292*, 5335-5348, doi:10.1074/jbc.M117.779520.
44. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
45. Makridakis, M.; Roubelakis, M.G.; Bitsika, V.; Dimuccio, V.; Samiotaki, M.; Kossida, S.; Panayotou, G.; Coleman, J.; Candiano, G.; Anagnou, N.P., et al. Analysis of secreted proteins for the study of bladder cancer cell aggressiveness. *Journal of proteome research* **2010**, *9*, 3243-3259, doi:10.1021/pr100189d.
46. Pusch, W.; Flocco, M.T.; Leung, S.M.; Thiele, H.; Kostrzewa, M. Mass spectrometry-based clinical proteomics. *Pharmacogenomics* **2003**, *4*, 463-476, doi:10.1517/phgs.4.4.463.22753.
47. Aebersold, R.; Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **2003**, *422*, 198-207, doi:10.1038/nature01511.
48. Domon, B.; Aebersold, R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* **2006**, *312*, 212-217, doi:10.1126/science.1124619.
49. Filip, S.; Vougas, K.; Zoidakis, J.; Latosinska, A.; Mullen, W.; Spasovski, G.; Mischak, H.; Vlahou, A.; Jankowski, J. Comparison of Depletion Strategies for the Enrichment of Low-Abundance Proteins in Urine. *PloS one* **2015**, *10*, e0133773, doi:10.1371/journal.pone.0133773.
50. Serang, O.; Noble, W. A review of statistical methods for protein identification using tandem mass spectrometry. *Statistics and its interface* **2012**, *5*, 3-20.
51. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* **2003**, *13*, 2498-2504, doi:10.1101/gr.1239303.

52. Bindea, G.; Mlecnik, B.; Hackl, H.; Charoentong, P.; Tosolini, M.; Kirilovsky, A.; Fridman, W.H.; Pages, F.; Trajanoski, Z.; Galon, J. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1091-1093, doi:10.1093/bioinformatics/btp101.
53. Ponzone, A.; Spada, M.; Ferraris, S.; Dianzani, I.; de Sanctis, L. Dihydropteridine reductase deficiency in man: from biology to treatment. *Medicinal research reviews* **2004**, *24*, 127-150, doi:10.1002/med.10055.
54. Lee, C.K.; Han, J.S.; Won, K.J.; Jung, S.H.; Park, H.J.; Lee, H.M.; Kim, J.; Park, Y.S.; Kim, H.J.; Park, P.J., et al. Diminished expression of dihydropteridine reductase is a potent biomarker for hypertensive vessels. *Proteomics* **2009**, *9*, 4851-4858, doi:10.1002/pmic.200800973.
55. Tojo, A.; Welch, W.J.; Bremer, V.; Kimoto, M.; Kimura, K.; Omata, M.; Ogawa, T.; Vallance, P.; Wilcox, C.S. Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney international* **1997**, *52*, 1593-1601.
56. Wang, Q.Z.; Gao, H.Q.; Liang, Y.; Zhang, J.; Wang, J.; Qiu, J. Cofilin1 is involved in hypertension-induced renal damage via the regulation of NF-kappaB in renal tubular epithelial cells. *Journal of translational medicine* **2015**, *13*, 323, doi:10.1186/s12967-015-0685-8.
57. Dendorfer, A.; Wolfrum, S.; Wagemann, M.; Qadri, F.; Dominiak, P. Pathways of bradykinin degradation in blood and plasma of normotensive and hypertensive rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **2001**, *280*, H2182-2188, doi:10.1152/ajpheart.2001.280.5.H2182.
58. Ersahin, C.; Simmons, W.H. Inhibition of both aminopeptidase P and angiotensin-converting enzyme prevents bradykinin degradation in the rat coronary circulation. *Journal of cardiovascular pharmacology* **1997**, *30*, 96-101.
59. Flydal, M.I.; Martinez, A. Phenylalanine hydroxylase: function, structure, and regulation. *IUBMB life* **2013**, *65*, 341-349, doi:10.1002/iub.1150.
60. Reaux, A.; Iturrioz, X.; Vazeux, G.; Fournie-Zaluski, M.C.; David, C.; Roques, B.P.; Corvol, P.; Llorens-Cortes, C. Aminopeptidase A, which generates one of the main effector peptides of the brain renin-angiotensin system, angiotensin III, has a key role in central control of arterial blood pressure. *Biochemical Society transactions* **2000**, *28*, 435-440.

61. Danziger, R.S. Aminopeptidase N in arterial hypertension. *Heart failure reviews* **2008**, *13*, 293-298, doi:10.1007/s10741-007-9061-y.
62. Lee, C.T.; Ng, H.Y.; Lee, Y.T.; Lai, L.W.; Lien, Y.H. The role of calbindin-D28k on renal calcium and magnesium handling during treatment with loop and thiazide diuretics. *American journal of physiology. Renal physiology* **2016**, *310*, F230-236, doi:10.1152/ajprenal.00057.2015.
63. Chang, I.Y.; Yoon, S.P. The changes of calretinin immunoreactivity in paraquat-induced nephrotoxic rats. *Acta histochemica* **2012**, *114*, 836-841, doi:10.1016/j.acthis.2012.02.005.
64. Zheng, H.; Lu, G.M. Reduction of prohibitin expression contributes to left ventricular hypertrophy via enhancement of mitochondrial reactive oxygen species formation in spontaneous hypertensive rats. *Free radical research* **2015**, *49*, 164-174, doi:10.3109/10715762.2014.991724.
65. Zhou, T.B.; Qin, Y.H.; Lei, F.Y.; Huang, W.F.; Drummen, G.P. Prohibitin attenuates oxidative stress and extracellular matrix accumulation in renal interstitial fibrosis disease. *PloS one* **2013**, *8*, e77187, doi:10.1371/journal.pone.0077187.
66. Ising, C.; Bharill, P.; Brinkkoetter, S.; Brahler, S.; Schroeter, C.; Koehler, S.; Hagmann, H.; Merkwirth, C.; Hohne, M.; Muller, R.U., et al. Prohibitin-2 Depletion Unravels Extra-Mitochondrial Functions at the Kidney Filtration Barrier. *The American journal of pathology* **2016**, *186*, 1128-1139, doi:10.1016/j.ajpath.2015.12.018.
67. Westermeier, R. 2D gel-based Proteomics: there's life in the old dog yet. *Archives of physiology and biochemistry* **2016**, *122*, 236-237, doi:10.1080/13813455.2016.1179766.
68. Nangaku, M. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure. *Internal medicine* **2004**, *43*, 9-17, doi:10.2169/internalmedicine.43.9.
69. McDonough, A.A.; Nguyen, M.T. Maintaining Balance Under Pressure: Integrated Regulation of Renal Transporters During Hypertension. *Hypertension* **2015**, *66*, 450-455, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.04593.
70. Venkatachalam, M.A.; Griffin, K.A.; Lan, R.; Geng, H.; Saikumar, P.; Bidani, A.K. Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease. *American journal of physiology. Renal physiology* **2010**, *298*, F1078-1094, doi:10.1152/ajprenal.00017.2010.

71. Lee, H.; Abe, Y.; Lee, I.; Shrivastav, S.; Crusan, A.P.; Huttemann, M.; Hopfer, U.; Felder, R.A.; Asico, L.D.; Armando, I., et al. Increased mitochondrial activity in renal proximal tubule cells from young spontaneously hypertensive rats. *Kidney international* **2014**, *85*, 561-569, doi:10.1038/ki.2013.397.
72. Chan, S.H.; Tai, M.H.; Li, C.Y.; Chan, J.Y. Reduction in molecular synthesis or enzyme activity of superoxide dismutases and catalase contributes to oxidative stress and neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Free radical biology & medicine* **2006**, *40*, 2028-2039, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.01.032.
73. Shokoji, T.; Nishiyama, A.; Fujisawa, Y.; Hitomi, H.; Kiyomoto, H.; Takahashi, N.; Kimura, S.; Kohno, M.; Abe, Y. Renal sympathetic nerve responses to tempol in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **2003**, *41*, 266-273.
74. Schnackenberg, C.G.; Wilcox, C.S. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin f2alpha. *Hypertension* **1999**, *33*, 424-428.
75. Nabha, L.; Garbern, J.C.; Buller, C.L.; Charpie, J.R. Vascular oxidative stress precedes high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Clinical and experimental hypertension* **2005**, *27*, 71-82.
76. Ulmasov, B.; Bruno, J.; Gordon, N.; Hartnett, M.E.; Edwards, J.C. Chloride intracellular channel protein-4 functions in angiogenesis by supporting acidification of vacuoles along the intracellular tubulogenic pathway. *The American journal of pathology* **2009**, *174*, 1084-1096, doi:10.2353/ajpath.2009.080625.
77. Wang, H.; D'Ambrosio, M.A.; Garvin, J.L.; Ren, Y.; Carretero, O.A. Connecting tubule glomerular feedback in hypertension. *Hypertension* **2013**, *62*, 738-745, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01846.
78. Ren, Y.; Garvin, J.L.; Liu, R.; Carretero, O.A. Cross-talk between arterioles and tubules in the kidney. *Pediatric nephrology* **2009**, *24*, 31-35, doi:10.1007/s00467-008-0852-8.
79. Vallon, V.; Platt, K.A.; Cunard, R.; Schroth, J.; Whaley, J.; Thomson, S.C.; Koepsell, H.; Rieg, T. SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2011**, *22*, 104-112, doi:10.1681/ASN.2010030246.
80. Krause, M.; Samoylenko, A.; Vainio, S.J. Exosomes as renal inductive signals in health and disease, and their application as diagnostic markers and therapeutic

- agents. *Frontiers in cell and developmental biology* **2015**, *3*, 65, doi:10.3389/fcell.2015.00065.
81. Bernatova, I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? *BioMed research international* **2014**, *2014*, 598271, doi:10.1155/2014/598271.
  82. Bernatova, I.; Conde, M.V.; Kopincova, J.; Gonzalez, M.C.; Puzserova, A.; Arribas, S.M. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: focus on methodological aspects. *Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension* **2009**, *27*, S27-31, doi:10.1097/01.hjh.0000358834.18311.fc.
  83. Ferrao, F.M.; Lara, L.S.; Lowe, J. Renin-angiotensin system in the kidney: What is new? *World journal of nephrology* **2014**, *3*, 64-76, doi:10.5527/wjn.v3.i3.64.
  84. Kopf, P.G.; Campbell, W.B. Endothelial metabolism of angiotensin II to angiotensin III, not angiotensin (1-7), augments the vasorelaxation response in adrenal cortical arteries. *Endocrinology* **2013**, *154*, 4768-4776, doi:10.1210/en.2013-1160.
  85. Padia, S.H.; Kemp, B.A.; Howell, N.L.; Fournie-Zaluski, M.C.; Roques, B.P.; Carey, R.M. Conversion of renal angiotensin II to angiotensin III is critical for AT2 receptor-mediated natriuresis in rats. *Hypertension* **2008**, *51*, 460-465, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.103242.
  86. Chou, T.C.; Yen, M.H.; Li, C.Y.; Ding, Y.A. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* **1998**, *31*, 643-648.
  87. Huang, C.F.; Hsu, C.N.; Chien, S.J.; Lin, Y.J.; Huang, L.T.; Tain, Y.L. Aminoguanidine attenuates hypertension, whereas 7-nitroindazole exacerbates kidney damage in spontaneously hypertensive rats: the role of nitric oxide. *European journal of pharmacology* **2013**, *699*, 233-240, doi:10.1016/j.ejphar.2012.11.034.
  88. Mihout, F.; Shweke, N.; Bige, N.; Jouanneau, C.; Dussaule, J.C.; Ronco, P.; Chatziantoniou, C.; Boffa, J.J. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) induces chronic kidney disease through a mechanism involving collagen and TGF-beta1 synthesis. *The Journal of pathology* **2011**, *223*, 37-45, doi:10.1002/path.2769.
  89. Tomlinson, J.A.; Caplin, B.; Boruc, O.; Bruce-Cobbold, C.; Cutillas, P.; Dormann, D.; Faull, P.; Grossman, R.C.; Khadayate, S.; Mas, V.R., et al. Reduced Renal Methylarginine Metabolism Protects against Progressive Kidney Damage. *Journal*

- of the American Society of Nephrology : JASN* **2015**, *26*, 3045-3059, doi:10.1681/ASN.2014030280.
90. Rivera, J.C.; Noueihed, B.; Madaan, A.; Lahaie, I.; Pan, J.; Belik, J.; Chemtob, S. Tetrahydrobiopterin (BH4) deficiency is associated with augmented inflammation and microvascular degeneration in the retina. *Journal of neuroinflammation* **2017**, *14*, 181, doi:10.1186/s12974-017-0955-x.
91. Grobe, A.C.; Wells, S.M.; Benavidez, E.; Oishi, P.; Azakie, A.; Fineman, J.R.; Black, S.M. Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **2006**, *290*, L1069-1077, doi:10.1152/ajplung.00408.2005.
92. Kim, H.L.; Park, Y.S. Maintenance of cellular tetrahydrobiopterin homeostasis. *BMB reports* **2010**, *43*, 584-592, doi:10.5483/BMBRep.2010.43.9.584.
-

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**Πίνακας Παραρτήματος 1:** Οι πρωτεΐνες που αναγνωρίστηκαν με το MASCOT Server v2.0 από τις πρωτεϊνικές κηλίδες κατά την ανάλυση του νεφρικού παρεγχύματος των SHR και WKY ζώων με 2DE-MALDI TOF-MS καθώς και ο λόγος έκφρασης για κάθεμία από αυτές στις τρεις ηλικιακές ομάδες που μελετήθηκαν.

Spot ID	AccessionMod	Gene	MascotScore	MS Coverage	Protein MW	pI-Value	Fold change between SHR/WKY animals		
							at 6w	at 13w	at 20w
2	SUMO3_RAT	Sumo3	40	41	12562	5,5	0,8868126	2,10122164	0,694390716
3	GRP78_MOUSE	Hspa5	294	57	72492	4,9	0,697356239	1,285136286	0,182084177
3	GRP78_RAT	Hspa5	287	56	72473	4,9	0,697356239	1,285136286	0,182084177
4	SPA3L_RAT	Serpina3l	109	43	46419	5,4	1,808340728	1,111111111	0,199537348
5	CALR_RAT	Calr	225	50	48137	4,2	2,298738739	2,192090395	0,511052379
6	PDIA1_RAT	P4hb	182	50	57315	4,7	1,498452181	2,810124453	0,24098583
9	PYC_RAT	Pc	79	15	130436	6,4	0,906414301	2,811355311	0,558103179
10	HSP7C_RAT	Hspa8	237	58	71055	5,2	1,301320528	1,823550725	0,286868558
11	VATA_MOUSE	Atp6v1a	346	59	68625	5,3	1,637674419	4,016006098	0,260861917
12	GRP75_RAT	Hspa9	220	55	74097	5,9	0,735944944	2,30942133	0,137745764
13	HEMO_RAT	Hpx	121	31	52060	8,6	1,052210027	1,349901897	0,204643963
14	ALBU_RAT	Alb	524	63	70682	6,1	1,052467657	2,158724058	0,384608221
15	ALBU_RAT	Alb	458	66	70682	6,1	0,530963495	2,665756966	0,142407359
16	ALBU_RAT	Alb	251	61	70682	6,1	1,10599518	1,922702884	0,151472379
17	ALBU_RAT	Alb	281	53	70682	6,1	0,59000999	0,73788082	0,150478108
18	ODP2_RAT	Dlat	44	17	67637	9,5	1,464180123	2,175200803	0,30496885
19	ALBU_RAT-FRAG	Alb	167	38	70682	6,1	3,22889115	2,458284371	0,340709519

<b>20</b>	ALBU_RAT	Alb	74	23	70682	6,1	2,131424854	2,810958904	0,663605052
<b>21</b>	TCPA_RAT	Tcp1	50	17	60835	5,8	2,183321352	5,32688172	0,539382773
<b>22</b>	PDIA3_RAT	Pdia3	143	39	57044	5,8	0,57353138	1,8465765	0,323835125
<b>23</b>	SUOX_RAT	Suox	169	41	61167	6,4	1,91641791	3,154191617	0,414290397
<b>23</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	42	33	12562	5,5	1,91641791	3,154191617	0,414290397
<b>24</b>	PDIA3_RAT	Pdia3	132	39	57044	5,8	0,708971038	1,025300443	0,248756219
<b>24</b>	ALBU_RAT-FRAG	Alb	66	19	70682	6,1	0,708971038	1,025300443	0,248756219
<b>25</b>	CH60_RAT	Hspd1	254	54	61088	5,8	0,790605118	2,003693931	0,411613308
<b>27</b>	TCPE_RAT	Cct5	98	35	59955	5,4	0,539509912	1,01073779	0,592083333
<b>28</b>	ALBU_RAT	Alb	280	64	70682	6,1	2,318921362	2,732650739	0,239046829
<b>29</b>	QCR1_RAT	Uqcrc1	118	37	53500	5,5	1,314577449	2,58160505	0,474934037
<b>29</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	42	34	12562	5,5	1,314577449	2,58160505	0,474934037
<b>31</b>	QCR1_RAT	Uqcrc1	65	23	53500	5,5	0,530371714	1,689556509	0,200628366
<b>32</b>	GUAD_RAT	Gda	49	27	51554	5,5	1,709861451	2,974529347	0,446595778
<b>33</b>	PEPD_RAT	Pepd	114	37	55684	5,6	3,334801762	2,408235294	0,332301342
<b>34</b>	VATB2_RAT	Atp6v1b2	122	38	56857	5,5	0,863952679	2,191666667	0,28484737
<b>35</b>	NHRF1_RAT	Slc9a3r1	110	42	39149	5,6	1,09868691	1,157407407	0,292698766
<b>36</b>	VTDB_RAT	Gc	106	36	55106	5,6	1,198979592	1,795698925	0,379466038
<b>37</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	52	40	12562	5,5	1,493285228	6,793779581	0,532746823
<b>38</b>	ODO2_MESAU	DLST	97	86	16111	4,6	2,057138232	4,744444444	0,321830664
<b>38</b>	ODO2_RAT	Dlst	57	32	49236	9,7	2,057138232	4,744444444	0,321830664
<b>39</b>	CBPQ_RAT	Cpq	124	41	52066	6	1,292114983	4,156920799	0,268002028
<b>40</b>	ODO2_MESAU	DLST	58	55	16111	4,6	0,862784028	2,60277981	0,303987241
<b>41</b>	ENOA_RAT	Eno1	259	79	47440	6,2	0,344077217	1,967656232	0,17837623
<b>42</b>	ALBU_RAT-FRAG	Alb	73	26	70682	6,1	1,941797346	0,698534543	0,219412167
<b>43</b>	ALBU_RAT	Alb	167	44	70682	6,1	2,145163921	1,772843525	0,717607973
<b>43</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	41	42	12562	5,5	2,145163921	1,772843525	0,717607973
<b>44</b>	EFTU_RAT	Tufm	128	45	49890	7,9	0,532119124	0,91617357	0,493726132



<b>45</b>	AL7A1_RAT	Aldh7a1	101	35	59225	9	0,845453524	1,621034078	0,462878541
<b>46</b>	GATM_RAT	Gatm	158	47	48724	7,8	0,962271305	1,356661906	0,429842375
<b>47</b>	GATM_RAT	Gatm	115	33	48724	7,8	1,066564847	0,713019768	0,22265625
<b>48</b>	ACADL_RAT	Acadl	93	35	48242	8,7	2,078583287	1,406616306	0,290986515
<b>49</b>	GMDS_CRIGR	GMDS	51	28	42289	7	1,206028834	1,596841616	0,601200218
<b>50</b>	GLNA_RAT	Glul	123	44	42982	6,7	2,641386954	2,984103179	0,360658445
<b>51</b>	SRC_RAT	Src	40	18	60448	7,7	1,315618221	6,663421419	1,192944785
<b>52</b>	ODPA_RAT	Pdha1	101	40	43883	9,4	1,722745434	1,148012791	0,519930374
<b>53</b>	MMSA_RAT	Aldh6a1	107	45	58227	9,3	0,54785239	0,846975477	0,262333511
<b>54</b>	MMSA_RAT	Aldh6a1	81	29	58227	9,3	0,992068168	0,928740015	0,412729234
<b>55</b>	MMSA_RAT	Aldh6a1	192	42	58227	9,3	1,033622651	0,827463536	0,316731882
<b>56</b>	AL1A1_RAT	Aldh1a1	123	47	54994	8,9	0,808039615	1,055555556	0,213450937
<b>57</b>	ATPA_RAT	Atp5a1	154	47	59831	9,7	0,974319663	1,973758201	0,278630743
<b>58</b>	AGT2_RAT	Agxt2	93	28	57905	9,3	0,579050329	1,28359317	0,452883762
<b>59</b>	SCOT1_MOUSE	Oxct1	58	23	56352	9,5	1,637955513	0,538333886	0,523632197
<b>60</b>	FUMH_RAT	Fh	77	38	54714	9,7	0,830341113	1,417582418	0,488918609
<b>61</b>	FUMH_RAT	Fh	69	29	54714	9,7	2,705969706	4,002828854	0,434021427
<b>62</b>	AADAT_RAT	Aadat	94	35	48096	9	5,683147262	3,867494824	0,298765793
<b>63</b>	IDHP_RAT	Idh2	125	45	51391	9,6	1,801568989	3,361639824	0,422604423
<b>64</b>	IDHP_RAT	Idh2	131	44	51391	9,6	1,388286334	4,939522998	0,467473445
<b>65</b>	THIL_RAT	Acat1	154	59	45009	9,6	0,904345108	1,752475248	0,455957504
<b>66</b>	ALDOA_RAT	Aldoa	135	53	39783	9,2	3,206916594	1,724708171	0,477859956
<b>67</b>	ALDOB_RAT	Aldob	133	35	40049	9,5	1,665044073	4,167078596	0,373311142
<b>68</b>	THIM_RAT	Acaa2	103	55	42244	9,1	0,817612717	0,714994128	0,464954624
<b>69</b>	PGK1_RAT	Pgk1	124	46	44909	9	1,969553523	3,880448319	0,642206305
<b>70</b>	THIM_RAT	Acaa2	63	33	42244	9,1	0,691779452	1,162839688	0,415172414
<b>71</b>	ACADM_RAT	Acadm	117	39	46925	9,3	1,482758621	1,739757208	0,466852906
<b>71</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	42	39	12562	5,5	1,482758621	1,739757208	0,466852906

<b>72</b>	PGK1_RAT	Pgk1	88	47	44909	9	1,126177024	0,932870944	0,39392422
<b>73</b>	ASSY_RAT	Ass1	170	42	46752	8,5	1,136978107	0,774644735	0,301481286
<b>74</b>	ACON_RAT	Aco2	268	54	86121	8,7	0,62321269	1,691747573	0,362890896
<b>75</b>	ACON_RAT	Aco2	134	35	86121	8,7	0,651062648	1,366826156	0,456114332
<b>75</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	38	44	12562	5,5	0,651062648	1,366826156	0,456114332
<b>76</b>	ACON_RAT	Aco2	189	45	86121	8,7	0,447374788	1,064569536	0,334480216
<b>77</b>	TRFE_RAT	Tf	113	30	78512	7,8	3,18369453	1,173733804	0,342360085
<b>78</b>	TRFE_RAT	Tf	207	35	78512	7,8	1,515953307	2,103030303	0,316536551
<b>79</b>	TRFE_RAT	Tf	90	30	78512	7,8	0,536451749	2,153344209	0,263965268
<b>80</b>	TRFE_RAT	Tf	298	48	78512	7,8	0,383458647	1,832	0,373543124
<b>81</b>	ACSM2_RAT	Acsm2	52	19	64617	9,3	0,644621514	1,205551388	0,618364419
<b>82</b>	AIFM1_RAT	Aifm1	129	42	66966	9,7	0,522617479	0,981182796	0,20299208
<b>83</b>	ACSM2_RAT	Acsm2	79	34	64617	9,3	0,624326405	2,148981779	0,407323175
<b>84</b>	TKT_RAT	Tkt	149	34	68342	7,9	0,765321836	0,78887689	0,397644614
<b>85</b>	TKT_RAT	Tkt	59	25	68342	7,9	0,385591767	1,52816153	0,607071713
<b>86</b>	CATA_RAT	Cat	173	49	60062	7,3	1,684100081	0,731820287	0,267467517
<b>87</b>	CATA_RAT	Cat	251	56	60062	7,3	1,485079468	0,626901521	0,411591997
<b>87</b>	AL4A1_RAT	Aldh4a1	131	45	62286	7,8	1,485079468	0,626901521	0,411591997
<b>87</b>	GCC2_RAT	Gcc2	43	15	195875	4,91	1,485079468	0,626901521	0,411591997
<b>88</b>	CATA_RAT	Cat	205	54	60062	7,3	1,194905213	2,237812128	0,427930814
<b>89</b>	DHE3_RAT	Glud1	87	34	61719	8,8	1,207539522	0,582483503	9,35E-02
<b>90</b>	DHE3_RAT	Glud1	92	38	61719	8,8	0,736629667	0,789318755	0,404828748
<b>91</b>	MMSA_RAT	Aldh6a1	91	28	58227	9,3	0,369452663	1,134728033	0,617291602
<b>93</b>	AK1A1_RAT	Akr1a1	76	36	36711	7	0,729306348	2,01939488	0,496736965
<b>94</b>	HAOX2_RAT	Hao2	74	39	39633	8,8	1,165352557	4,384341637	0,438597831
<b>95</b>	DHSO_RAT	Sord	60	37	38780	7,9	0,63387603	2,403067746	0,201506591
<b>96</b>	DHSO_RAT	Sord	77	37	38780	7,9	0,656392388	1,133732535	0,438525256
<b>97</b>	G3P_RAT	Gapdh	104	58	36090	9	2,974899207	1,880947232	0,413625742

<b>98</b>	MDHM_RAT	Mdh2	102	50	36117	9,8	1,218936382	3,249329759	0,871264658
<b>99</b>	MDHM_RAT	Mdh2	143	68	36117	9,8	0,879582858	2,327543424	1,05629804
<b>100</b>	LDHA_RAT	Ldha	80	36	36712	9,3	1,04671089	1,593922652	0,832574189
<b>101</b>	VDAC1_RAT	Vdac1	147	63	30851	9,2	0,587484378	1,155865922	0,631013917
<b>103</b>	VDAC1_RAT	Vdac1	127	73	30851	9,2	0,676594846	1,143891403	0,335918396
<b>104</b>	MDHM_RAT	Mdh2	85	46	36117	9,8	0,844759394	2,522044479	1,212676794
<b>105</b>	ALDOB_RAT	Aldob	79	38	40049	9,5	2,672067039	6,50631136	1,674301242
<b>106</b>	CH60_MESAU- FRAG	HSPD1	71	45	29133	4,6	1,996657382	3,491285403	6,244288225
<b>106</b>	CH60_RAT-FRAG	Hspd1	53	26	61088	5,8	1,996657382	3,491285403	6,244288225
<b>107</b>	SDHB_RAT	Sdhb	46	34	32607	-1,3	3,734768481	8,412017167	1,225591716
<b>108</b>	SDHB_RAT	Sdhb	78	40	32607	-1,3	1,682734161	6,526959248	1,35637286
<b>109</b>	GSTA3_RAT	Gsta3	155	80	25360	9,3	2,332420404	4,956615691	1,716932357
<b>110</b>	GSTA1_RAT	Gsta1	69	34	25705	9,5	17,0115942	6,784687136	1,226332478
<b>111</b>	GSTA1_RAT	Gsta1	56	43	25705	9,5	11,65538462	32,89944134	1,810015898
<b>112</b>	ECHB_RAT	Hadhb	44	19	51667	10,1	2,86640557	0,917758573	2,555468135
<b>113</b>	HCD2_RAT	Hsd17b10	70	41	27343	9,7	3,054178916	3,351279788	1,285811578
<b>114</b>	MDHC_RAT	Mdh1	48	36	36631	6,2	4,318235064	4,008730159	1,649705176
<b>115</b>	PRDX1_RAT	Prdx1	207	74	22323	9,2	1,876394052	1,173239194	0,588360288
<b>115</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	46	44	12562	5,5	1,876394052	1,173239194	0,588360288
<b>116</b>	SODM_RAT	Sod2	58	37	24887	9,6	0,940005797	2,247666336	0,598431835
<b>117</b>	GFAP_RAT	Gfap	45	23	49984	5,2	2,063380282	5,141975309	0,951531601
<b>119</b>	GSTP1_RAT	Gstp1	71	64	23652	7,7	0,852083333	1,689521846	0,540321908
<b>120</b>	GSTM2_RAT	Gstm2	176	87	25857	7,7	0,895859085	1,16819788	0,716709922
<b>121</b>	ES1_RAT		76	57	28497	10	1,569444444	2,685279188	0,967365967
<b>122</b>	KAD4_RAT	Ak4	95	51	25301	8,9	2,141367005	1,01699612	0,915968707
<b>123</b>	HSP7C_RAT- FRAG	Hspa8	108	34	71055	5,2	0,976193772	1,628388669	2,805579036

<b>125</b>	CAH2_RAT	Ca2	105	71	29267	7,1	62,32544379	1,125239711	0,826867657
<b>126</b>	CAH2_RAT	Ca2	71	49	29267	7,1	8,586206897	0,680272895	0,291635747
<b>127</b>	HCDH_RAT	Hadh	86	43	34540	9,5	1,056501021	0,785130401	0,991007194
<b>128</b>	AK1A1_RAT	Akr1a1	166	57	36711	7	1,438226632	1,35348226	1,390731486
<b>130</b>	AK1A1_RAT	Akr1a1	186	63	36711	7	0,914856215	0,854291006	1,188289449
<b>131</b>	G3P_RAT	Gapdh	89	53	36090	9	1,240237827	0,886962891	0,465746315
<b>133</b>	G3P_RAT	Gapdh	119	51	36090	9	1,730250929	2,389064318	0,44448112
<b>134</b>	HAOX2_RAT	Hao2	185	73	39633	8,8	3,591714665	1,034140969	0,337026218
<b>135</b>	QOR_RAT	Cryz	101	37	35295	9,3	2,848484848	3,276595745	2,019088017
<b>136</b>	AK1A1_RAT- FRAG	Akr1a1	75	36	36711	7	2,328315412	1,894317049	2,307116105
<b>137</b>	PPIA_RAT	Ppia	87	64	18091	9,4	2,074357054	5,455238095	1,04509958
<b>138</b>	CRYAB_RAT	Cryab	113	68	20076	6,9	0,711583482	2,346526656	1,351209421
<b>140</b>	MMSA_MOUSE	Aldh6a1	59	18	58335	9,2	1,869581258	1,466751108	1,45972073
<b>141</b>	ATPA_RAT	Atp5a1	62	23	59831	9,7	0,493452555	0,839962477	0,812747512
<b>142</b>	ALDOB_MOUSE- FRAG	Aldob	66	35	39938	9,4	2,017826087	1,729680029	4,393782383
<b>143</b>	ATPA_RAT	Atp5a1	101	35	59831	9,7	1,049665585	1,58847051	1,170530327
<b>144</b>	GSTA4_RAT	Gsta4	79	41	25550	7,6	0,823343674	1,638228636	0,934109508
<b>145</b>	KAD4_RAT	Ak4	62	51	25301	8,9	0,692970334	0,623406425	0,673305039
<b>146</b>	TPIS_RAT	Tpi1	135	75	27345	7,7	0,755095757	3,16214442	1,183866754
<b>147</b>	PPM1B_RAT	Ppm1b	21	21	43489	4,7	0,82584493	1,783746826	2,693301049
<b>148</b>	DCXR_RAT	Dcxr	71	42	25931	7,8	0,811029033	2,473161931	0,95112782
<b>149</b>	NIT2_RAT	Nit2	103	47	31024	7,7	2,263985206	1,098735701	0,447956823
<b>150</b>	FAHD2_RAT	Fahd2	67	39	34958	9,6	0,771780822	2,540246555	0,981834905
<b>151</b>	G3P_RAT-LowerPI	Gapdh	52	27	36090	9	0,86475554	1,197044335	2,054914445
<b>153</b>	ESTD_RAT	Esd	52	36	31971	6,5	0,961613788	3,357142857	1,032161556
<b>154</b>	3HIDH_MESAU	HIBADH	63	49	13825	4,8	0,444219067	0,937883959	0,625290023

<b>154</b>	IDHC_RAT-FRAG	Idh1	57	22	47047	6,6	0,444219067	0,937883959	0,625290023
<b>154</b>	3HIDH_RAT	Hibadh	44	19	35679	9,55	0,444219067	0,937883959	0,625290023
<b>156</b>	ALDR_RAT	Akr1b1	146	49	36230	6,3	1,227321566	2,351351351	0,342853294
<b>156</b>	PPID_RAT	Ppid	44	22	41139	6,88	1,227321566	2,351351351	0,342853294
<b>158</b>	MYO16_MOUSE	Myo16	49	9	213815	6,5	0,739808153	2,723076923	0,710200191
<b>159</b>	Z354C_RAT	Znf354c	41	18	65919	9,6	0,876732859	1,94254835	0,950741525
<b>159</b>	ENPL_RAT	Hsp90b1	40	16	92998	4,6	0,876732859	1,94254835	0,950741525
<b>160</b>	PPIA_RAT	Ppia	68	60	18091	9,4	5,855598456	9,213379469	1,192561781
<b>162</b>	HSP7C_RAT-FRAG	Hspa8	95	28	71055	5,2	3,653411039	0,911648177	2,090774908
<b>164</b>	ACTB_RAT	Actb	95	35	42052	5,2	0,451862891	1,663118527	3,504946237
<b>165</b>	BRSK1_RAT	Brsk1	41	13	85700	10	0,231421558	3,467445743	1,078726227
<b>166</b>	F16P1_RAT	Fbp1	138	58	40040	5,4	0,796814841	1,41917692	0,727166276
<b>167</b>	ACTG_RAT	Actg1	211	74	42108	5,2	1,076507827	1,32108529	0,451672561
<b>168</b>	ATPB_RAT	Atp5b	126	45	56318	5,1	0,726399008	1,101152369	0,742364719
<b>169</b>	ACTG_RAT	Actg1	164	74	42108	5,2	0,98492339	20,82302511	1,651350776
<b>172</b>	ATPB_RAT	Atp5b	73	32	56318	5,1	0,446264074	1,953164557	1,457142857
<b>173</b>	MTG8_MOUSE	Runx1t1	42	21	64982	7,4	0,772068766	1,669829222	1,825938567
<b>174</b>	RGN_RAT	Rgn	138	70	33939	5,1	3,587807097	7,127031019	1,204869857
<b>175</b>	ODPB_RAT	Pdhb	86	29	39299	6,2	0,58098357	1,304260852	0,540469424
<b>177</b>	TBB4B_MESAU	TUBB4B	148	76	32181	6,3	0,725927848	2,478699552	11,80994152
<b>177</b>	TBB4B_RAT	Tubb4b	117	48	50225	4,6	0,725927848	2,478699552	11,80994152
<b>178</b>	TBA1C_RAT	Tuba1c	71	29	50590	4,83	1,556507298	5,441033612	2,043172769
<b>179</b>	ENOA_RAT	Eno1	114	44	47440	6,2	0,56647357	3,190970835	1,750650195
<b>181</b>	F16P1_RAT	Fbp1	205	64	40040	5,4	1,51946678	2,850316919	0,551933453
<b>182</b>	ALBU_RAT-FRAG	Alb	52	16	70682	6,1	1,07521797	1,022732147	0,324485059
<b>183</b>	ALBU_RAT-FRAG	Alb	43	22	70682	6,1	1,1865732	0,59552115	0,299643017
<b>184</b>	SUCB2_MOUSE	Suc1g2	143	41	47096	6,7	0,984295478	0,911818739	0,330270962

<b>185</b>	ALBU_RAT-FRAG	Alb	127	38	70682	6,1	2,556569343	1,16721044	0,364182091
<b>186</b>	PPIA_RAT	Ppia	59	49	18091	9,4	4	3,656963021	1,158856469
<b>188</b>	NDKB_RAT	Nme2	94	78	17386	7,8	0,814515304	1,214114696	1,021984631
<b>190</b>	CALB1_RAT	Calb1	108	55	30203	4,6	0,53769629	1,40752397	0,569507541
<b>192</b>	TPM4_RAT	Tpm4	127	59	28549	4,5	1,398973755	2,293315143	0,258612463
<b>195</b>	PRDX2_RAT	Prdx2	74	39	21941	5,2	1,510467522	0,925504332	0,415961453
<b>196</b>	PRDX2_RAT	Prdx2	61	43	21941	5,2	0,856040609	4,227191413	0,706743516
<b>197</b>	PEBP1_RAT	Pebp1	106	75	20902	5,4	21,78198198	1,457406403	0,652622061
<b>197</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	40	43	12562	5,5	21,78198198	1,457406403	0,652622061
<b>198</b>	PEBP1_RAT	Pebp1	118	79	20902	5,4	12,21611722	0,582556987	0,485566813
<b>199</b>	ALBU_RAT	Alb	93	17	70682	6,1	6,041224971	3,850115296	0,55001598
<b>200</b>	ALBU_RAT	Alb	89	20	70682	6,1	1,111452708	3,819788584	1,058592435
<b>200</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	44	44	12562	5,5	1,111452708	3,819788584	1,058592435
<b>201</b>	ATPB_RAT	Atp5b	68	30	56318	5,1	0,503290786	1,010896309	1,048924076
<b>201</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	60	52	12562	5,5	0,503290786	1,010896309	1,048924076
<b>202</b>	ATPB_MOUSE	Atp5b	68	28	56265	5,1	0,470123583	2,164766839	1,208711434
<b>202</b>	ATPB_RAT	Atp5b	58	25	56318	5,06	0,470123583	2,164766839	1,208711434
<b>206</b>	NDUS3_MOUSE	Ndufs3	116	37	30302	6,8	0,773638344	0,449092742	0,408960915
<b>206</b>	NDUS3_MESAU	NDUFS3	95	78	11214	5,57	0,773638344	0,449092742	0,408960915
<b>207</b>	IAH1_RAT	Iah1	187	71	28386	5,6	0,815678753	1,218717414	0,629183136
<b>208</b>	PHB_RAT	Phb	64	37	29859	5,5	0,577687146	0,602073467	1,864830054
<b>209</b>	CLIC4_MOUSE	Clic4	55	35	28939	5,32	1,504760226	9,740279938	2,770220187
<b>209</b>	CLIC4_RAT	Clic4	43		28843	5,88	1,504760226	9,740279938	2,770220187
<b>210</b>	ACTB_CRIGR-FRAG	ACTB	85	33	42053	5,1	0,377755511	3,689495366	9,869978858
<b>210</b>	ACTG_RAT-FRAG	Actg1	82	27	42108	5,2	0,377755511	3,689495366	9,869978858
<b>211</b>	F16P1_RAT	Fbp1	95	38	40040	5,4	0,563297872	1,251724138	5,138709677
<b>212</b>	GSH0_MOUSE	Gclm	52	32	30858	5,2	0,376846171	1,82622739	0,556177678

<b>213</b>	3HAO_RAT	Haa0	221	79	32846	5,5	0,615261473	2,304347826	0,663043478
<b>214</b>	ACY3_RAT	Acy3	55	35	35796	5,3	1,757834758	13,03787879	2,899006623
<b>215</b>	3HAO_RAT	Haa0	54	28	32846	5,5	0,404501821	1,118362832	0,629012597
<b>216</b>	ACY3_RAT- HighestPI	Acy3	86	50	35796	5,3	0,203651116	2,329831933	0,418794014
<b>216</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	43	43	12562	5,5	0,203651116	2,329831933	0,418794014
<b>217</b>	ANXA4_RAT	Anxa4	72	37	36168	5,2	1,230083234	1,368075117	2,642133693
<b>219</b>	ACY3_RAT	Acy3	53	33	35796	5,3	3,215116279	1,939058172	6,079069767
<b>220</b>	CLIC1_RAT	Clic1	58	42	27306	4,9	1,081683168	4,960912052	0,848995984
<b>221</b>	CALM_RAT	Calm1	77	57	16827	3,9	0,814303739	2,036081646	1,057543558
<b>223</b>	MYL6_MOUSE	Myl6	51	39	17090	4,4	0,710353386	1,859547471	0,586046154
<b>225</b>	CYB5_MOUSE	Cyb5a	38	41	15232	4,8	0,765603924	6,946490219	3,343407631
<b>227</b>	ODO2_MESAU	DLST	82	62	16111	4,6	1,014836184	1,8647343	1,5
<b>227</b>	ODO2_RAT	Dlst	47	20	49236	9,67	1,014836184	1,8647343	1,5
<b>229</b>	ABHEB_RAT	Abhd14b	40	27	22718	5,6	2,218694885	3,103626943	20,1796875
<b>230</b>	ABHEB_RAT	Abhd14b	55	38	22718	5,6	0,715533981	3,372093023	9,267605634
<b>232</b>	UBN1_MOUSE- FRAG	Ubn1	41	11	122888	9,9	1,480214949	1,402649538	47,84337349
<b>234</b>	COX5A_RAT	Cox5a	58	53	16347	6,1	2,091070974	2,707914175	0,807362535
<b>235</b>	COX5A_RAT	Cox5a	58	48	16347	6,1	8,063777596	1,601296758	1,398599869
<b>236</b>	PARK7_RAT	Park7	87	59	20190	6,4	0,858894482	1,460798718	0,93700469
<b>238</b>	PRDX3_RAT	Prdx3	41	44	28563	8	1,855796912	2,585336538	1,94980695
<b>239</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	50	43	12562	5,5	1,220369759	2,605798576	1,967332123
<b>240</b>	AK1A1_CRIGR	AKR1A1	53	29	25605	5,8	0,647407304	1,445230237	1,410671463
<b>241</b>	AK1A1_RAT	Akr1a1	120	44	36711	7	1,888255151	2,701404056	0,765658174
<b>242</b>	PBLD_RAT	Pbld	57	33	31952	5,9	1,335978836	6,448095594	12,32798165
<b>242</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	41	43	12562	5,5	1,335978836	6,448095594	12,32798165
<b>243</b>	VTDB_RAT	Gc	41	20	55106	5,6	1,553092784	1,583452211	1,223788546

<b>245</b>	MDHC_RAT	Mdh1	79	42	36631	6,2	1,165848982	0,994150961	0,601151553
<b>245</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	40	44	12562	5,5	1,165848982	0,994150961	0,601151553
<b>246</b>	CRYL1_RAT	Cryl1	73	31	35717	5,9	1,160546282	3,074702886	0,343839542
<b>247</b>	CK054_RAT	CK054	133	43	35427	6,2	2,666487069	1,081616261	1,274694654
<b>248</b>	K1C10_RAT	Krt10	84	30	56699	5	1,889583333	4,2618683	0,20964247
<b>249</b>	ALDR_RAT	Akr1b1	95	32	36230	6,3	0,91687253	3,732924021	0,440231362
<b>250</b>	GALM_RAT	Galm	62	36	38097	6,2	1,959884351	3,912870159	0,718634198
<b>251</b>	MYO16_MOUSE	Myo16	48	8	213815	6,5	0,637356187	1,784913793	1,154145078
<b>251</b>	PYRD2_RAT	Pyroxd2	45	19	63410	9,3	0,637356187	1,784913793	1,154145078
<b>252</b>	ACY1A_RAT	Acy1a	120	52	46060	6	2,474436742	8,373271889	1,92238806
<b>255</b>	MUP_RAT	MUP	73	60	21009	5,8	4,577114428	0,895188285	1,558740602
<b>256</b>	MUP_RAT	MUP	80	53	21009	5,8	0,216104204	0,830966227	0,325143379
<b>257</b>	MUP_RAT	MUP	80	64	21009	5,8	1,628712871	0,939186384	0,7609692
<b>258</b>	FABPH_RAT	Fabp3	122	82	14766	5,9	0,417558887	2,052700491	1,64732747
<b>259</b>	ACY1A_RAT	Acy1a	200	76	46060	6	0,356328919	2,381825591	0,483165296
<b>260</b>	ACY1A_RAT	Acy1a	172	58	46060	6	2,015806602	4,28340081	1,503972758
<b>261</b>	ACY1A_RAT	Acy1a	161	61	46060	6	2,183087217	3,198515045	0,392432432
<b>262</b>	OAT_RAT	Oat	145	52	48701	6,6	1,555477156	6,300673149	0,309673416
<b>263</b>	ENOA_RAT	Eno1	79	50	47440	6,2	0,996780129	3,491157247	0,499044392
<b>264</b>	ENOA_RAT	Eno1	115	61	47440	6,2	0,260829634	2,42413442	0,373722628
<b>265</b>	ENOA_RAT	Eno1	165	74	47440	6,2	0,324624245	0,800678541	0,223621363
<b>266</b>	CH60_MESAU	HSPD1	105	77	29133	4,6	2,297297297	4,74497992	1,007867972
<b>266</b>	CH60_RAT	Hspd1	70	39	61088	5,8	2,297297297	4,74497992	1,007867972
<b>267</b>	ACY1A_RAT	Acy1a	139	48	46060	6	0,64516129	2,125860374	0,493407593
<b>268</b>	ENOA_MESAU	ENO1	62	51	24107	5,2	1,087656223	2,454210769	0,35750332
<b>268</b>	ENOA_RAT	Eno1	59	27	47440	6,2	1,087656223	2,454210769	0,35750332
<b>269</b>	SUCB1_MESAU	SUCLA2	53	36	24405	5	1,039420485	2,927353127	0,421889444
<b>270</b>	ALDH2_MESAU	ALDH2	82	30	54813	5,8	1,170191339	5,210338681	1,253706755



<b>270</b>	ALDH2_RAT	Aldh2	80	29	56966	6,8	1,170191339	5,210338681	1,253706755
<b>271</b>	ACY2_RAT	Aspa	80	43	35747	5,9	0,74015395	2,188479544	0,56460965
<b>272</b>	NDUAA_RAT-FRAG	Ndufa10	56	35	40753	8,5	0,822081368	1,460948905	0,433235867
<b>273</b>	LDHB_RAT	Ldhb	184	57	36874	5,6	1,11915493	1,130961169	0,258973454
<b>274</b>	DDAH1_RAT	Ddah1	150	55	31805	5,7	1,974429682	1,032649254	0,274006418
<b>275</b>	PGK1_RAT	Pgk1	61	35	44909	9	1,015568615	1,178475336	0,3226082
<b>275</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	44	43	12562	5,5	1,015568615	1,178475336	0,3226082
<b>276</b>	ENOA_RAT	Eno1	65	29	47440	6,2	0,915498652	3,014686248	1,690349947
<b>277</b>	NDUAA_RAT	Ndufa10	75	37	40753	8,5	1,378966455	10,23228346	2,587982833
<b>278</b>	ALBU_RAT	Alb	68	24	70682	6,1	1,219953596	1,429016189	0,984034833
<b>279</b>	ENOA_RAT	Eno1	90	34	47440	6,2	0,64057508	1,359304572	0,65412844
<b>280</b>	ALBU_RAT-FRAG	Alb	53	21	70682	6,1	1,40806293	2,134532991	0,458969466
<b>282</b>	CIP2A_MOUSE	Kiaa1524	47	15	103176	5,9	0,833641832	1,476857491	0,862673187
<b>283</b>	NIT1_RAT	Nit1	63	48	32697	5,9	0,76318927	2,254009698	0,945467176
<b>283</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	52	50	12562	5,5	0,76318927	2,254009698	0,945467176
<b>285</b>	PHB_MESAU	PHB	76	77	10037	4,4	0,714245732	1,635092467	2,659459459
<b>285</b>	GAMT_RAT	Gamt	62	45	26675	5,7	0,714245732	1,635092467	2,659459459
<b>285</b>	PHB_RAT	Phb	57	31	29859	5,5	0,714245732	1,635092467	2,659459459
<b>287</b>	PRDX6_RAT	Prdx6	61	46	24860	5,6	2,22E-02	0,162243151	1,34E-02
<b>288</b>	PRDX6_RAT	Prdx6	178	74	24860	5,6	0,75542848	0,877481679	0,442774454
<b>289</b>	ATP5H_RAT	Atp5h	102	73	18809	6,2	4,527920693	2,126916803	0,701846804
<b>289</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	45	44	12562	5,5	4,527920693	2,126916803	0,701846804
<b>290</b>	F221A_MOUSE	Fam221a	43	31	34123	9,2	1,550945865	1,043201398	3,887022901
<b>291</b>	ATPA_RAT-FRAG	Atp5a1	47	22	59831	9,7	0,591479139	1,80019685	3,550340651
<b>295</b>	TPIS_RAT-FRAG	Tpi1	74	55	27345	7,7	8,816849817	1,035280509	2,234666667
<b>296</b>	PGLT1_RAT	Poglut1	56	26	46993	9,7	0,884365734	0,583106267	1,548012663
<b>297</b>	PARK7_RAT	Park7	42	42	20190	6,4	1,416414141	0,426028921	0,774476376

<b>298</b>	KCY_RAT	Cmpk1	48	40	22383	5,5	0,361448803	1,196382429	0,630578512
<b>300</b>	SODC_RAT	Sod1	48	38	16073	5,9	15,30511247	0,909252945	0,566786504
<b>301</b>	ALBU_RAT-FRAG	Alb	62	17	70682	6,1	3,865895954	1,403951701	6,362204724
<b>303</b>	SODC_RAT	Sod1	81	47	16073	5,9	14,52205882	2,177976953	0,153322658
<b>304</b>	MUP_RAT	MUP	95	64	21009	5,8	1,033103448	0,10809628	0,265899824
<b>306</b>	TTHY_RAT	Ttr	97	60	15824	5,7	2,42012498	1,392640108	0,466469256
<b>308</b>	HBB_SPEBE	HBB_	48	61	15872	9,2	0,674526401	0,929274843	3,189925681
<b>309</b>	HAOX2_RAT-FRAG	Hao2	60	30	39633	8,8	1,367482574	2,329991646	19,92899408
<b>311</b>	PGAM1_RAT	Pgam1	101	57	28928	6,8	1,007142378	1,469287469	0,773895541
<b>312</b>	TPIS_RAT	Tpi1	151	82	27345	7,7	1,9493274	1,227917981	0,427964301
<b>313</b>	ETFA_MOUSE	Etfa	74	41	35330	9,5	1,063189381	1,183089638	0,662133142
<b>314</b>	ALDOB_MOUSE	Aldob	114	38	39938	9,4	1,534196608	1,826268465	0,561281088
<b>315</b>	TPIS_RAT	Tpi1	91	69	27345	7,7	1,441899146	1,986308149	0,554950826
<b>317</b>	FAHD1_RAT	Fahd1	84	50	24750	8,8	1,293824228	1,725223475	0,935464415
<b>318</b>	HSP7C_RAT	Hspa8	105	30	71055	5,2	1,224103867	3,214154749	0,767065603
<b>320</b>	ALBU_RAT	Alb	160	40	70682	6,1	1,83881488	1,522285966	0,564621857
<b>321</b>	PDIA3_RAT	Pdia3	254	54	57044	5,8	1,619080407	3,67816092	0,654243484
<b>323</b>	ATPB_RAT	Atp5b	151	48	56318	5,1	0,736226611	4,417115903	0,356333319
<b>323</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	51	51	12562	5,5	0,736226611	4,417115903	0,356333319
<b>326</b>	CRYL1_RAT	Cryl1	84	38	35717	5,9	0,952998244	3,135935866	0,582151866
<b>326</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	43	44	12562	5,5	0,952998244	3,135935866	0,582151866
<b>335</b>	TTHY_RAT	Ttr	76	59	15824	5,7	1,501434034	1,648082163	0,648728109
<b>336</b>	AGT2_RAT	Agxt2	140	36	57905	9,3	0,969065343	1,467269824	0,424743189
<b>337</b>	HAOX2_RAT	Hao2	146	61	39633	8,8	1,031902303	1,099399693	0,418345324
<b>339</b>	ALDH2_RAT	Aldh2	131	47	56966	6,8	1,463233533	2,353818828	0,469723882
<b>341</b>	ENPL_RAT	Hsp90b1	62	17	92998	4,6	1,485386953	1,782745923	0,559564604
<b>342</b>	NHRF3_RAT	Pdzk1	75	33	57164	5,15	1,225048924	1,409322651	0,392700172

<b>343</b>	PYC_RAT	Pc	130	28	130436	6,4	1,05752809	1,263279446	0,497135843
<b>344</b>	HSP7C_RAT	Hspa8	183	58	71055	5,2	1,108575155	1,954848261	0,343601896
<b>344</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	50	44	12562	5,5	1,108575155	1,954848261	0,343601896
<b>346</b>	ENOA_MESAU	ENO1	46	38	24107	5,2	0,686199167	0,996835443	0,498094028
<b>347</b>	IVD_RAT	Ivd	87	37	46862	9	2,787733971	2,84762533	0,393529803
<b>348</b>	ARK72_RAT	Akr7a2	89	42	41105	9,2	1,45073517	2,564378645	0,703331659
<b>350</b>	G3P_RAT	Gapdh	60	35	36090	9	2,443844728	0,766696533	0,376974775
<b>351</b>	DCXR_RAT	Dcxr	69	42	25931	7,8	10,07936508	7,024390244	4,30449827
<b>352</b>	GPDA_RAT	Gpd1	87	40	38112	6,2	1,454927088	2,288178914	0,556537925
<b>352</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	44	50	12562	5,5	1,454927088	2,288178914	0,556537925
<b>353</b>	CK054_RAT	CK054	60	30	35427	6,2	0,902525372	1,978484779	0,948583703
<b>354</b>	CATA_RAT	Cat	152	51	60062	7,3	3,326111424	1,737901665	0,507297971
<b>355</b>	TPM3_RAT	Tpm3	165	55	29217	4,6	1,144128868	0,607534333	6,85E-02
<b>358</b>	SUMO3_RAT	Sumo3	55	43	12562	5,5	0,331939937	2,766950722	0,805768249

**Πίνακας Παραρτήματος 2:** Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται οι διαφορετικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες στα SHR 6 εβδομάδων όπως προέκυψαν από το Ingenuity Pathways Analysis

Ingenuity Canonical Pathways	$-\log(p\text{-value})$	Ratio	Molecules
<b>Glycolysis I</b>	6,28E00	1,6E-01	ENO3,ALDOC,GAPDH,ALDOA
<b>Gluconeogenesis I</b>	6,28E00	1,6E-01	ENO3,ALDOC,GAPDH,ALDOA
<b>Glutathione-mediated Detoxification</b>	5,95E00	1,33E-01	Gsta1,GSTA3,GSTO1,Gstm3
<b>LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function</b>	5,78E00	3,2E-02	Gsta1,GSTA3,IL18,GSTO1,FABP3,Gstm3,ALDH4A1
<b>NRF2-mediated Oxidative Stress Response</b>	5,11E00	3,33E-02	Gsta1,GSTA3,GSTO1,SOD1,Gstm3,GCLM
<b>Valine Degradation I</b>	4,86E00	1,67E-01	BCKDHA,HIBADH,HADHB
<b>Tryptophan Degradation III (Eukaryotic)</b>	4,72E00	1,5E-01	HSD17B10,HAAO,HADHB
<b>Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling</b>	4,47E00	3,57E-02	Gsta1,GSTA3,GSTO1,Gstm3,ALDH4A1
<b>Fatty Acid <math>\beta</math>-oxidation I</b>	4,17E00	1E-01	HSD17B10,IVD,HADHB
<b>Mitochondrial Dysfunction</b>	4,06E00	2,92E-02	SDHB,HSD17B10,COX5A,SDHA,ATP5H
<b>Oxidative Phosphorylation</b>	3,71E00	3,67E-02	SDHB,COX5A,SDHA,ATP5H
<b>Sucrose Degradation V (Mammalian)</b>	3,61E00	2,22E-01	ALDOC,ALDOA
<b>Glutaryl-CoA Degradation</b>	3,43E00	1,82E-01	HSD17B10,HADHB
<b>Isoleucine Degradation I</b>	3,22E00	1,43E-01	HSD17B10,HADHB
<b>Xenobiotic Metabolism Signaling</b>	3,14E00	1,85E-02	Gsta1,GSTA3,GSTO1,Gstm3,ALDH4A1
<b>TCA Cycle II (Eukaryotic)</b>	2,78E00	8,7E-02	SDHB,SDHA
<b>Amyotrophic Lateral Sclerosis Signaling</b>	2,66E00	3,06E-02	GLUL,SOD1,NEFL
<b>Glutamine Biosynthesis I</b>	2,58E00	1E00	GLUL
<b>Ethanol Degradation II</b>	2,47E00	6,06E-02	HSD17B10,ALDH4A1
<b>Noradrenaline and Adrenaline Degradation</b>	2,42E00	5,71E-02	HSD17B10,ALDH4A1
<b>Proline Degradation</b>	2,28E00	5E-01	ALDH4A1
<b>4-hydroxyproline Degradation I</b>	2,28E00	5E-01	ALDH4A1
<b>NADH Repair</b>	2,1E00	3,33E-01	GAPDH
<b>Glutathione Biosynthesis</b>	2,1E00	3,33E-01	GCLM
<b>Ascorbate Recycling (Cytosolic)</b>	2,1E00	3,33E-01	GSTO1
<b>Arsenate Detoxification I (Glutaredoxin)</b>	1,98E00	2,5E-01	GSTO1
<b>Branched-chain <math>\alpha</math>-keto acid Dehydrogenase Complex</b>	1,98E00	2,5E-01	BCKDHA
<b>Arginine Degradation I (Arginase Pathway)</b>	1,98E00	2,5E-01	ALDH4A1
<b>Serotonin Degradation</b>	1,96E00	3,33E-02	HSD17B10,ALDH4A1
<b>Superoxide Radicals Degradation</b>	1,8E00	1,67E-01	SOD1
<b>Glucose and Glucose-1-phosphate Degradation</b>	1,68E00	1,25E-01	RGN
<b>Tryptophan Degradation to 2-amino-3-carboxymuconate Semialdehyde</b>	1,68E00	1,25E-01	HAAO
<b>Leucine Degradation I</b>	1,63E00	1,11E-01	IVD

<b>Ketolysis</b>	1,63E00	1,11E-01	HADHB
<b>Ketogenesis</b>	1,58E00	1E-01	HADHB
<b>Ubiquinol-10 Biosynthesis (Eukaryotic)</b>	1,47E00	7,69E-02	BCKDHA
<b>Mevalonate Pathway I</b>	1,47E00	7,69E-02	HADHB
<b>Histamine Degradation</b>	1,47E00	7,69E-02	ALDH4A1
<b>Vitamin-C Transport</b>	1,44E00	7,14E-02	GSTO1
<b>NAD biosynthesis II (from tryptophan)</b>	1,41E00	6,67E-02	HAAO
<b><math>\gamma</math>-glutamyl Cycle</b>	1,41E00	6,67E-02	GCLM
<b>Fatty Acid <math>\alpha</math>-oxidation</b>	1,38E00	6,25E-02	ALDH4A1
<b>Oxidative Ethanol Degradation III</b>	1,38E00	6,25E-02	ALDH4A1
<b>Putrescine Degradation III</b>	1,36E00	5,88E-02	ALDH4A1
<b>Superpathway of Geranylgeranyldiphosphate Biosynthesis I (via Mevalonate)</b>	1,36E00	5,88E-02	HADHB
<b>Tryptophan Degradation X (Mammalian, via Tryptamine)</b>	1,33E00	5,56E-02	ALDH4A1
<b>Ethanol Degradation IV</b>	1,33E00	5,56E-02	ALDH4A1
<b>Granzyme A Signaling</b>	1,29E00	5E-02	HIST1H1C
<b>Endoplasmic Reticulum Stress Pathway</b>	1,27E00	4,76E-02	CALR
<b>Maturity Onset Diabetes of Young (MODY) Signaling</b>	1,25E00	4,55E-02	GAPDH
<b>Pyrimidine Deoxyribonucleotides De Novo Biosynthesis I</b>	1,25E00	4,55E-02	CMPK1
<b>Dopamine Degradation</b>	1,21E00	4,17E-02	ALDH4A1
<b>Lipid Antigen Presentation by CD1</b>	1,18E00	3,85E-02	CALR
<b>Pyrimidine Ribonucleotides Interconversion</b>	1,16E00	3,7E-02	CMPK1
<b>Superpathway of Cholesterol Biosynthesis</b>	1,15E00	3,57E-02	HADHB
<b>Pyrimidine Ribonucleotides De Novo Biosynthesis</b>	1,13E00	3,45E-02	CMPK1
<b>RhoGDI Signaling</b>	1,12E00	1,16E-02	MYLPPF,GDI2
<b>Estrogen Biosynthesis</b>	1,03E00	2,7E-02	HSD17B10
<b>Antigen Presentation Pathway</b>	1,03E00	2,7E-02	CALR
<b>Role of Hypercytokinemia/hyperchemokinaemia in the Pathogenesis of Influenza</b>	9,5E-01	2,22E-02	IL18
<b>Graft-versus-Host Disease Signaling</b>	9,24E-01	2,08E-02	IL18
<b>Huntington's Disease Signaling</b>	9,1E-01	8,7E-03	SDHB,SDHA
<b>Signaling by Rho Family GTPases</b>	8,97E-01	8,55E-03	MYLPPF,GFAP
<b>Phospholipase C Signaling</b>	8,82E-01	8,37E-03	PEBP1,MYLPPF
<b>Unfolded protein response</b>	8,76E-01	1,85E-02	CALR
<b>Role of Cytokines in Mediating Communication between Immune Cells</b>	8,61E-01	1,79E-02	IL18
<b>Glutamate Receptor Signaling</b>	8,54E-01	1,75E-02	GLUL
<b>Estrogen-Dependent Breast Cancer Signaling</b>	8,2E-01	1,61E-02	HSD17B10
<b>IL-10 Signaling</b>	7,83E-01	1,47E-02	IL18
<b>T Helper Cell Differentiation</b>	7,66E-01	1,41E-02	IL18
<b>Toll-like Receptor Signaling</b>	7,5E-01	1,35E-02	IL18
<b>TREM1 Signaling</b>	7,45E-01	1,33E-02	IL18
<b>VDR/RXR Activation</b>	7,29E-01	1,28E-02	PSMC5

<b>Altered T Cell and B Cell Signaling in Rheumatoid Arthritis</b>	6,82E-01	1,14E-02	IL18
<b>Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells</b>	6,78E-01	1,12E-02	IL18
<b>PAK Signaling</b>	6,78E-01	1,12E-02	MYLPP
<b>Apoptosis Signaling</b>	6,78E-01	1,12E-02	LMNA
<b>Regulation of Actin-based Motility by Rho</b>	6,69E-01	1,1E-02	MYLPP
<b>Communication between Innate and Adaptive Immune Cells</b>	6,69E-01	1,1E-02	IL18
<b>Death Receptor Signaling</b>	6,65E-01	1,09E-02	LMNA
<b>PPAR Signaling</b>	6,57E-01	1,06E-02	IL18
<b>Salvage Pathways of Pyrimidine Ribonucleotides</b>	6,53E-01	1,05E-02	CMPK1
<b>Antioxidant Action of Vitamin C</b>	6,45E-01	1,03E-02	GSTO1
<b>Cholecystokinin/Gastrin-mediated Signaling</b>	6,3E-01	9,9E-03	IL18
<b>Androgen Signaling</b>	5,94E-01	9,01E-03	CALR
<b>IL-6 Signaling</b>	5,78E-01	8,62E-03	IL18
<b>14-3-3-mediated Signaling</b>	5,74E-01	8,55E-03	GFAP
<b>Gα12/13 Signaling</b>	5,74E-01	8,55E-03	MYLPP
<b>p38 MAPK Signaling</b>	5,74E-01	8,55E-03	IL18
<b>Protein Kinase A Signaling</b>	5,67E-01	5,18E-03	HIST1H1C,MYLPP
<b>HMGB1 Signaling</b>	5,65E-01	8,33E-03	IL18
<b>LXR/RXR Activation</b>	5,62E-01	8,26E-03	IL18
<b>RhoA Signaling</b>	5,59E-01	8,2E-03	MYLPP
<b>Atherosclerosis Signaling</b>	5,56E-01	8,13E-03	IL18
<b>FXR/RXR Activation</b>	5,44E-01	7,87E-03	IL18
<b>Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses</b>	5,44E-01	7,87E-03	IL18
<b>Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)</b>	5,38E-01	7,75E-03	MYLPP
<b>IL-12 Signaling and Production in Macrophages</b>	5,22E-01	7,41E-03	IL18
<b>CXCR4 Signaling</b>	4,79E-01	6,58E-03	MYLPP
<b>Hepatic Cholestasis</b>	4,57E-01	6,17E-03	IL18
<b>Cdc42 Signaling</b>	4,46E-01	5,99E-03	MYLPP
<b>Acute Phase Response Signaling</b>	4,42E-01	5,92E-03	IL18
<b>NF-κB Signaling</b>	4,34E-01	5,78E-03	IL18
<b>RAR Activation</b>	4,28E-01	5,68E-03	PSMC5
<b>Granulocyte Adhesion and Diapedesis</b>	4,26E-01	5,65E-03	IL18
<b>Sertoli Cell-Sertoli Cell Junction Signaling</b>	4,24E-01	5,62E-03	SPTB
<b>Calcium Signaling</b>	4,24E-01	5,62E-03	CALR
<b>PPARα/RXRα Activation</b>	4,22E-01	5,59E-03	ACADL
<b>Dendritic Cell Maturation</b>	4,22E-01	5,59E-03	IL18
<b>IL-8 Signaling</b>	4,15E-01	5,46E-03	CSTB
<b>Agranulocyte Adhesion and Diapedesis</b>	4,04E-01	5,29E-03	IL18
<b>Thrombin Signaling</b>	4,01E-01	5,24E-03	MYLPP
<b>Actin Cytoskeleton Signaling</b>	3,59E-01	4,61E-03	MYLPP
<b>Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis</b>	3,56E-01	4,57E-03	IL18
<b>Systemic Lupus Erythematosus Signaling</b>	3,54E-01	4,55E-03	IL18

<b>Cardiac Hypertrophy Signaling</b>	3,5E-01	4,48E-03	MYLPF
<b>Protein Ubiquitination Pathway</b>	3,08E-01	3,92E-03	PSMC5
<b>Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis</b>	2,62E-01	3,36E-03	IL18

**Πίνακας Παραρτήματος 3:** Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται οι διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες στα SHR 13 εβδομάδων όπως προέκυψαν από το Ingenuity Pathways Analysis

Ingenuity Canonical Pathways	$-\log(p\text{-value})$	Ratio	Molecules
<b>Remodeling of Epithelial Adherens Junctions</b>	1,31E01	1,62E-01	TUBB2A, SRC, ACTG1, TUBB3, TUBB, ACTC1, TUBB2B, ACTA2, ACTA1, TUBA1C, TUBB4B
<b>Sertoli Cell-Sertoli Cell Junction Signaling</b>	1,21E01	7,87E-02	SRC, TUBB3, TUBB, ACTC1, ACTA2, TUBA1C, TUBB4B, RAB8B, TUBB2A, ACTG1, TUBB2B, ACTA1, SPTB, SPTAN1
<b>Epithelial Adherens Junction Signaling</b>	1,06E01	8,22E-02	TUBB2A, MYH7, SRC, ACTG1, TUBB3, TUBB, ACTC1, TUBB2B, ACTA2, ACTA1, TUBA1C, TUBB4B
<b>TCA Cycle II (Eukaryotic)</b>	1,06E01	3,04E-01	SDHB, FH, SDHA, DLST, MDH2, SUCLA2, MDH1
<b>14-3-3-mediated Signaling</b>	1,04E01	9,4E-02	TUBB2A, VIM, SRC, TUBB3, TUBB, TUBB2B, PDIA3, TUBA1C, YWHAE, TUBB4B, GFAP
<b>Gap Junction Signaling</b>	1,03E01	7,74E-02	TUBB2A, SRC, ACTG1, TUBB3, TUBB, ACTC1, TUBB2B, PDIA3, ACTA2, ACTA1, TUBA1C, TUBB4B
<b>Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling</b>	1,02E01	7,5E-02	TUBB2A, SRC, ACTG1, TUBB3, TUBB, ACTC1, TUBB2B, ACTA2, ACTA1, TUBA1C, TUBB4B, RAB8B
<b>Mitochondrial Dysfunction</b>	8,64E00	6,43E-02	NDUFA10, SDHB, SOD2, UQCRC1, HSD17B10, CYB5A, COX5A, SDHA, CASP3, ATP5H, PRDX3
<b>NRF2-mediated Oxidative Stress Response</b>	7,29E00	5,56E-02	AKR7A2, SOD2, Gsta1, GSTA3, GSTO1, ACTG1, ACTC1, EPHX1, ACTA2, ACTA1
<b>Sucrose Degradation V (Mammalian)</b>	7E00	4,44E-01	ALDOB, KHK, Tpi1 (includes others), GALM
<b>Death Receptor Signaling</b>	6,17E00	7,61E-02	ACTG1, ACTC1, CASP3, ACTA2, ACTA1, LMNA, SPTAN1
<b>Oxidative Phosphorylation</b>	5,67E00	6,42E-02	NDUFA10, SDHB, UQCRC1, CYB5A, COX5A, SDHA, ATP5H
<b>Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)</b>	5,18E00	5,43E-02	Calm1 (includes others), MYH7, ACTG1, ACTC1, PDIA3, ACTA2, ACTA1
<b>Gluconeogenesis I</b>	5,02E00	1,6E-01	ALDOB, MDH2, ENO1, MDH1
<b>VEGF Signaling</b>	4,99E00	6,59E-02	SRC, ACTG1, ACTC1, ACTA2, ACTA1, YWHAE
<b>Ethanol Degradation II</b>	4,53E00	1,21E-01	ALDH9A1, HSD17B10, ALDH7A1, ALDH2
<b>Agrin Interactions at Neuromuscular Junction</b>	4,44E00	7,25E-02	SRC, ACTG1, ACTC1, ACTA2, ACTA1
<b>Noradrenaline and Adrenaline Degradation</b>	4,42E00	1,14E-01	ALDH9A1, HSD17B10, ALDH7A1, ALDH2
<b>Histamine Degradation</b>	4,37E00	2,31E-01	ALDH9A1, ALDH7A1, ALDH2
<b>Caveolar-mediated Endocytosis</b>	4,35E00	6,94E-02	SRC, ACTG1, ACTC1, ACTA2, AC



<b>Signaling</b>			TA1
<b>ILK Signaling</b>	4,16E00	3,76E-02	VIM,MYH7,ACTG1,ACTC1,CAS P3,ACTA2,ACTA1
<b>Mechanisms of Viral Exit from Host Cells</b>	4,15E00	9,76E-02	ACTG1,ACTC1,ACTA2,ACTA1
<b>Fatty Acid <math>\alpha</math>-oxidation</b>	4,08E00	1,88E-01	ALDH9A1,ALDH7A1,ALDH2
<b>Oxidative Ethanol Degradation III</b>	4,08E00	1,88E-01	ALDH9A1,ALDH7A1,ALDH2
<b>Breast Cancer Regulation by Stathmin1</b>	4,08E00	3,66E-02	TUBB2A,Calm1 (includes others),TUBB3,TUBB,TUBB2B,TUBA1C,TUBB4B
<b>D-glucuronate Degradation I</b>	4,06E00	6,67E-01	DCXR,CRYL1
<b>Putrescine Degradation III</b>	4E00	1,76E-01	ALDH9A1,ALDH7A1,ALDH2
<b>FAK Signaling</b>	3,95E00	5,75E-02	SRC,ACTG1,ACTC1,ACTA2,ACTA1
<b>MSP-RON Signaling Pathway</b>	3,95E00	8,7E-02	ACTG1,ACTC1,ACTA2,ACTA1
<b>Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling</b>	3,94E00	4,29E-02	Gsta1,GSTA3,GSTO1,ALDH9A1, SRC,ALDH7A1
<b>Tryptophan Degradation X (Mammalian, via Tryptamine)</b>	3,92E00	1,67E-01	ALDH9A1,ALDH7A1,ALDH2
<b>Ethanol Degradation IV</b>	3,92E00	1,67E-01	ALDH9A1,ALDH7A1,ALDH2
<b>Virus Entry via Endocytic Pathways</b>	3,91E00	5,62E-02	SRC,ACTG1,ACTC1,ACTA2,ACTA1
<b>Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells</b>	3,91E00	5,62E-02	IL18,ACTG1,ACTC1,ACTA2,ACTA1
<b>Fcy Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes</b>	3,82E00	5,38E-02	SRC,ACTG1,ACTC1,ACTA2,ACTA1
<b>LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function</b>	3,71E00	3,2E-02	Gsta1,GSTA3,IL18,GSTO1,ALDH9A1,FABP3,ALDH7A1
<b>Paxillin Signaling</b>	3,63E00	4,9E-02	SRC,ACTG1,ACTC1,ACTA2,ACTA1
<b>Dopamine Degradation</b>	3,54E00	1,25E-01	ALDH9A1,ALDH7A1,ALDH2
<b>Tight Junction Signaling</b>	3,52E00	3,59E-02	MYH7,ACTG1,ACTC1,ACTA2,ACTA1,SPTAN1
<b>Serotonin Degradation</b>	3,5E00	6,67E-02	ALDH9A1,HSD17B10,ALDH7A1,ALDH2
<b>Glycolysis I</b>	3,49E00	1,2E-01	ALDOB,Tpi1 (includes others),ENO1
<b>RhoGDI Signaling</b>	3,44E00	3,47E-02	SRC,ACTG1,ACTC1,GDI2,ACTA2,ACTA1
<b>Calcium Signaling</b>	3,37E00	3,37E-02	CALR,Calm1 (includes others),MYH7,ACTC1,ACTA2,ACTA1
<b>Glutathione-mediated Detoxification</b>	3,25E00	1E-01	Gsta1,GSTA3,GSTO1
<b>Agranulocyte Adhesion and Diapedesis</b>	3,24E00	3,17E-02	IL18,MYH7,ACTG1,ACTC1,ACTA2,ACTA1
<b>Aspartate Degradation II</b>	3,22E00	2,86E-01	MDH2,MDH1
<b>Glutaryl-CoA Degradation</b>	2,81E00	1,82E-01	HSD17B10,ACAT1
<b>Tec Kinase Signaling</b>	2,77E00	3,16E-02	SRC,ACTG1,ACTC1,ACTA2,ACTA1
<b>Signaling by Rho Family GTPases</b>	2,76E00	2,56E-02	VIM,ACTG1,ACTC1,ACTA2,ACTA1,GFAP

<b>Axonal Guidance Signaling</b>	2,6E00	1,85E-02	TUBB2A,TUBB3,TUBB,SHANK2, TUBB2B,PDIA3,TUBA1C,TUBB 4B
<b>Isoleucine Degradation I</b>	2,59E00	1,43E-01	HSD17B10,ACAT1
<b>Methylglyoxal Degradation III</b>	2,53E00	1,33E-01	AKR7A2,AKR1B1
<b>Clathrin-mediated Endocytosis Signaling</b>	2,47E00	2,7E-02	SRC,ACTG1,ACTC1,ACTA2,AC TA1
<b>Xenobiotic Metabolism Signaling</b>	2,44E00	2,21E-02	Gsta1,GSTA3,GSTO1,ALDH9A1, ALDH7A1,ESD
<b>RhoA Signaling</b>	2,36E00	3,28E-02	ACTG1,ACTC1,ACTA2,ACTA1
<b>Leukocyte Extravasation Signaling</b>	2,35E00	2,53E-02	SRC,ACTG1,ACTC1,ACTA2,AC TA1
<b>Integrin Signaling</b>	2,31E00	2,48E-02	SRC,ACTG1,ACTC1,ACTA2,AC TA1
<b>Tryptophan Degradation III (Eukaryotic)</b>	2,28E00	1E-01	HSD17B10,ACAT1
<b>Glutamine Biosynthesis I</b>	2,27E00	1E00	GLUL
<b>Sulfite Oxidation IV</b>	2,27E00	1E00	SUOX
<b>Endoplasmic Reticulum Stress Pathway</b>	2,24E00	9,52E-02	CALR,CASP3
<b>Actin Cytoskeleton Signaling</b>	2,18E00	2,3E-02	MYH7,ACTG1,ACTC1,ACTA2,A CTA1
<b>Lipid Antigen Presentation by CD1</b>	2,06E00	7,69E-02	CALR,PDIA3
<b>Choline Degradation I</b>	1,97E00	5E-01	ALDH7A1
<b>Formaldehyde Oxidation II (Glutathione-dependent)</b>	1,97E00	5E-01	ESD
<b>Fatty Acid <math>\beta</math>-oxidation I</b>	1,94E00	6,67E-02	HSD17B10,IVD
<b>Apoptosis Signaling</b>	1,9E00	3,37E-02	CASP3,LMNA,SPTAN1
<b>Regulation of Actin-based Motility by Rho</b>	1,87E00	3,3E-02	ACTC1,ACTA2,ACTA1
<b>L-carnitine Biosynthesis</b>	1,79E00	3,33E-01	ALDH9A1
<b>Thyronamine and Iodothyronamine Metabolism</b>	1,79E00	3,33E-01	DIO1
<b>Ascorbate Recycling (Cytosolic)</b>	1,79E00	3,33E-01	GSTO1
<b>Glycerol-3-phosphate Shuttle</b>	1,79E00	3,33E-01	GPD1
<b>Thyroid Hormone Metabolism I (via Deiodination)</b>	1,79E00	3,33E-01	DIO1
<b>Antigen Presentation Pathway</b>	1,77E00	5,41E-02	CALR,PDIA3
<b>Arsenate Detoxification I (Glutaredoxin)</b>	1,67E00	2,5E-01	GSTO1
<b>2-ketoglutarate Dehydrogenase Complex</b>	1,67E00	2,5E-01	DLST
<b>Branched-chain <math>\alpha</math>-keto acid Dehydrogenase Complex</b>	1,67E00	2,5E-01	BCKDHA
<b>Phenylethylamine Degradation I</b>	1,67E00	2,5E-01	ALDH2
<b>Arginine Degradation I (Arginase Pathway)</b>	1,67E00	2,5E-01	OAT
<b>Role of Tissue Factor in Cancer</b>	1,66E00	2,73E-02	SRC,CASP3,P4HB
<b>Androgen Signaling</b>	1,65E00	2,7E-02	CALR,Calm1 (includes others),SRC
<b>Lysine Degradation II</b>	1,57E00	2E-01	ALDH7A1
<b>Lysine Degradation V</b>	1,57E00	2E-01	ALDH7A1

<b>Galactose Degradation I (Leloir Pathway)</b>	1,57E00	2E-01	GALM
<b>p70S6K Signaling</b>	1,57E00	2,52E-02	SRC,PDIA3,YWHAE
<b>Arginine Biosynthesis IV</b>	1,49E00	1,67E-01	OAT
<b>Proline Biosynthesis II (from Arginine)</b>	1,49E00	1,67E-01	OAT
<b>Arginine Degradation VI (Arginase 2 Pathway)</b>	1,49E00	1,67E-01	OAT
<b>Glycerol Degradation I</b>	1,49E00	1,67E-01	GPD1
<b>Superoxide Radicals Degradation</b>	1,49E00	1,67E-01	SOD2
<b>Unfolded protein response</b>	1,46E00	3,7E-02	CALR,P4HB
<b>Acetyl-CoA Biosynthesis I (Pyruvate Dehydrogenase Complex)</b>	1,43E00	1,43E-01	DLAT
<b>Nur77 Signaling in T Lymphocytes</b>	1,42E00	3,51E-02	Calm1 (includes others),CASP3
<b>Glutamate Receptor Signaling</b>	1,42E00	3,51E-02	Calm1 (includes others),GLUL
<b>Myc Mediated Apoptosis Signaling</b>	1,4E00	3,45E-02	CASP3,YWHAE
<b>Glucose and Glucose-1-phosphate Degradation</b>	1,37E00	1,25E-01	RGN
<b>Citrulline Biosynthesis</b>	1,37E00	1,25E-01	OAT
<b>Estrogen-Dependent Breast Cancer Signaling</b>	1,35E00	3,23E-02	HSD17B10,SRC
<b>ERK5 Signaling</b>	1,34E00	3,17E-02	SRC,YWHAE
<b>Leucine Degradation I</b>	1,32E00	1,11E-01	IVD
<b>Ketolysis</b>	1,32E00	1,11E-01	ACAT1
<b>Aldosterone Signaling in Epithelial Cells</b>	1,3E00	1,97E-02	CRYAB,HSPD1,PDIA3
<b>Ketogenesis</b>	1,28E00	1E-01	ACAT1
<b>Melatonin Signaling</b>	1,26E00	2,86E-02	Calm1 (includes others),PDIA3
<b>Chemokine Signaling</b>	1,25E00	2,82E-02	Calm1 (includes others),SRC
<b>Protein Kinase A Signaling</b>	1,23E00	1,3E-02	HIST1H1C,Calm1 (includes others),PDIA3,YWHAE,DUSP22
<b>Endothelin-1 Signaling</b>	1,18E00	1,75E-02	SRC,CASP3,PDIA3
<b>Ubiquinol-10 Biosynthesis (Eukaryotic)</b>	1,17E00	7,69E-02	BCKDHA
<b>Oleate Biosynthesis II (Animals)</b>	1,17E00	7,69E-02	CYB5A
<b>Mevalonate Pathway I</b>	1,17E00	7,69E-02	ACAT1
<b>Guanosine Nucleotides Degradation III</b>	1,17E00	7,69E-02	GDA
<b>Superpathway of Citrulline Metabolism</b>	1,13E00	7,14E-02	OAT
<b>Phenylalanine Degradation IV (Mammalian, via Side Chain)</b>	1,13E00	7,14E-02	ALDH2
<b>Vitamin-C Transport</b>	1,13E00	7,14E-02	GSTO1
<b>Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy</b>	1,13E00	1,68E-02	Calm1 (includes others),SRC,PDIA3
<b>TR/RXR Activation</b>	1,11E00	2,35E-02	DIO1,ENO1
<b>Telomere Extension by Telomerase</b>	1,11E00	6,67E-02	HNRNPA2B1
<b>nNOS Signaling in Skeletal</b>	1,11E00	6,67E-02	Calm1 (includes others)

<b>Muscle Cells</b>			
<b>Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis</b>	1,1E00	1,34E-02	IL18,Calm1 (includes others),SRC,PDIA3
<b>RANK Signaling in Osteoclasts</b>	1,08E00	2,27E-02	Calm1 (includes others),SRC
<b>UVA-Induced MAPK Signaling</b>	1,08E00	2,27E-02	CASP3,PDIA3
<b>Granzyme B Signaling</b>	1,08E00	6,25E-02	CASP3
<b>Parkinson's Signaling</b>	1,08E00	6,25E-02	CASP3
<b><math>\gamma</math>-linolenate Biosynthesis II (Animals)</b>	1,05E00	5,88E-02	CYB5A
<b>Superpathway of Geranylgeranyldiphosphate Biosynthesis I (via Mevalonate)</b>	1,05E00	5,88E-02	ACAT1
<b>Valine Degradation I</b>	1,03E00	5,56E-02	BCKDHA
<b>Antioxidant Action of Vitamin C</b>	1,01E00	2,06E-02	GSTO1,PDIA3
<b>Amyotrophic Lateral Sclerosis Signaling</b>	1E00	2,04E-02	GLUL,CASP3
<b>Neuropathic Pain Signaling In Dorsal Horn Neurons</b>	9,89E-01	2E-02	SRC,PDIA3
<b>Cardiomyocyte Differentiation via BMP Receptors</b>	9,87E-01	5E-02	MYH7
<b>Granzyme A Signaling</b>	9,87E-01	5E-02	HIST1H1C
<b>Purine Nucleotides Degradation II (Aerobic)</b>	9,87E-01	5E-02	GDA
<b>Cholecystokinin/Gastrin-mediated Signaling</b>	9,82E-01	1,98E-02	IL18,SRC
<b>Maturity Onset Diabetes of Young (MODY) Signaling</b>	9,48E-01	4,55E-02	ALDOB
<b>Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis</b>	9,34E-01	1,37E-02	IL18,Calm1 (includes others),SRC
<b>Sphingosine-1-phosphate Signaling</b>	9,27E-01	1,83E-02	CASP3,PDIA3
<b>Type I Diabetes Mellitus Signaling</b>	9,21E-01	1,82E-02	HSPD1,CASP3
<b>Tumoricidal Function of Hepatic Natural Killer Cells</b>	9,12E-01	4,17E-02	CASP3
<b>Huntington's Disease Signaling</b>	8,88E-01	1,3E-02	SDHB,SDHA,CASP3
<b>Synaptic Long Term Potentiation</b>	8,65E-01	1,68E-02	Calm1 (includes others),PDIA3
<b>Sperm Motility</b>	8,59E-01	1,67E-02	Calm1 (includes others),PDIA3
<b>Superpathway of Cholesterol Biosynthesis</b>	8,5E-01	3,57E-02	ACAT1
<b>PI3K Signaling in B Lymphocytes</b>	8,15E-01	1,56E-02	Calm1 (includes others),PDIA3
<b>Thyroid Hormone Metabolism II (via Conjugation and/or Degradation)</b>	8,09E-01	3,23E-02	DIO1
<b>Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target</b>	7,96E-01	3,12E-02	CASP3

<b>Cells</b>			
<b>Superpathway of Methionine Degradation</b>	7,96E-01	3,12E-02	SUOX
<b>Retinol Biosynthesis</b>	7,84E-01	3,03E-02	ESD
<b>TWEAK Signaling</b>	7,72E-01	2,94E-02	CASP3
<b>Inhibition of Angiogenesis by TSP1</b>	7,72E-01	2,94E-02	CASP3
<b>eNOS Signaling</b>	7,49E-01	1,42E-02	Calm1 (includes others),CASP3
<b>Estrogen Biosynthesis</b>	7,39E-01	2,7E-02	HSD17B10
<b>Glioblastoma Multiforme Signaling</b>	7,26E-01	1,37E-02	SRC,PDIA3
<b>Gαq Signaling</b>	7,22E-01	1,36E-02	Calm1 (includes others),RGS16
<b>Docosahexaenoic Acid (DHA) Signaling</b>	7,18E-01	2,56E-02	CASP3
<b>Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response</b>	7,08E-01	2,5E-02	CASP3
<b>Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease</b>	7,08E-01	2,5E-02	YWHAE
<b>UVC-Induced MAPK Signaling</b>	6,89E-01	2,38E-02	SRC
<b>iNOS Signaling</b>	6,72E-01	2,27E-02	Calm1 (includes others)
<b>Role of Hypercytokinemia/hyperchemokemia in the Pathogenesis of Influenza</b>	6,63E-01	2,22E-02	IL18
<b>Dopamine-DARPP32 Feedback in cAMP Signaling</b>	6,63E-01	1,24E-02	Calm1 (includes others),PDIA3
<b>nNOS Signaling in Neurons</b>	6,46E-01	2,13E-02	Calm1 (includes others)
<b>Graft-versus-Host Disease Signaling</b>	6,38E-01	2,08E-02	IL18
<b>Acute Phase Response Signaling</b>	6,32E-01	1,18E-02	SOD2,IL18
<b>TNFR1 Signaling</b>	6,3E-01	2,04E-02	CASP3
<b>Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation</b>	6,3E-01	2,04E-02	YWHAE
<b>CREB Signaling in Neurons</b>	6,24E-01	1,17E-02	Calm1 (includes others),PDIA3
<b>CD27 Signaling in Lymphocytes</b>	6,08E-01	1,92E-02	CASP3
<b>PPARα/RXRα Activation</b>	5,96E-01	1,12E-02	GPD1,PDIA3
<b>Dendritic Cell Maturation</b>	5,96E-01	1,12E-02	IL18,PDIA3
<b>Lymphotoxin β Receptor Signaling</b>	5,94E-01	1,85E-02	CASP3
<b>IL-8 Signaling</b>	5,83E-01	1,09E-02	SRC,CSTB

<b>Role of Cytokines in Mediating Communication between Immune Cells</b>	5,8E-01	1,79E-02	IL18
<b>Wnt/Ca+ pathway</b>	5,8E-01	1,79E-02	PDIA3
<b>EGF Signaling</b>	5,8E-01	1,79E-02	SRC
<b>Phospholipases</b>	5,74E-01	1,75E-02	PDIA3
<b>Regulation of Cellular Mechanics by Calpain Protease</b>	5,74E-01	1,75E-02	SRC
<b>Thrombin Signaling</b>	5,57E-01	1,05E-02	SRC,PDIA3
<b>Induction of Apoptosis by HIV1</b>	5,55E-01	1,67E-02	CASP3
<b>Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation</b>	5,38E-01	1,02E-02	MYH7,ACTA2
<b>Antiproliferative Role of Somatostatin Receptor 2</b>	5,37E-01	1,59E-02	SRC
<b>Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis</b>	5,31E-01	1,56E-02	Calm1 (includes others)
<b>Retinoic acid Mediated Apoptosis Signaling</b>	5,31E-01	1,56E-02	CASP3
<b>Hypoxia Signaling in the Cardiovascular System</b>	5,25E-01	1,54E-02	P4HB
<b>Erythropoietin Signaling</b>	5,15E-01	1,49E-02	SRC
<b>GABA Receptor Signaling</b>	5,15E-01	1,49E-02	ALDH9A1
<b>IL-10 Signaling</b>	5,09E-01	1,47E-02	IL18
<b>Role of MAPK Signaling in the Pathogenesis of Influenza</b>	5,09E-01	1,47E-02	CASP3
<b>Macropinocytosis Signaling</b>	5,09E-01	1,47E-02	SRC
<b>CCR5 Signaling in Macrophages</b>	5,04E-01	1,45E-02	Calm1 (includes others)
<b>T Helper Cell Differentiation</b>	4,94E-01	1,41E-02	IL18
<b>Renal Cell Carcinoma Signaling</b>	4,94E-01	1,41E-02	FH
<b>PEDF Signaling</b>	4,94E-01	1,41E-02	SOD2
<b>GPCR-Mediated Integration of Enteroendocrine Signaling Exemplified by an L Cell</b>	4,94E-01	1,41E-02	PDIA3
<b>STAT3 Pathway</b>	4,84E-01	1,37E-02	SRC
<b>Leptin Signaling in Obesity</b>	4,79E-01	1,35E-02	PDIA3
<b>Toll-like Receptor Signaling</b>	4,79E-01	1,35E-02	IL18
<b>cAMP-mediated signaling</b>	4,77E-01	9,13E-03	Calm1 (includes others),SRC
<b>TREM1 Signaling</b>	4,74E-01	1,33E-02	IL18

<b>Systemic Lupus Erythematosus Signaling</b>	4,74E-01	9,09E-03	IL18,HNRNPA2B1
<b>Cardiac Hypertrophy Signaling</b>	4,67E-01	8,97E-03	Calm1 (includes others),PDIA3
<b>PDGF Signaling</b>	4,65E-01	1,3E-02	SRC
<b>Reelin Signaling in Neurons</b>	4,56E-01	1,27E-02	SRC
<b>Regulation of IL-2 Expression in Activated and Anergic T Lymphocytes</b>	4,56E-01	1,27E-02	Calm1 (includes others)
<b>Colorectal Cancer Metastasis Signaling</b>	4,35E-01	8,47E-03	SRC,CASP3
<b>Melanocyte Development and Pigmentation Signaling</b>	4,35E-01	1,19E-02	SRC
<b>GPCR-Mediated Nutrient Sensing in Enteroendocrine Cells</b>	4,35E-01	1,19E-02	PDIA3
<b>Phospholipase C Signaling</b>	4,29E-01	8,37E-03	Calm1 (includes others),SRC
<b>HIPPO signaling</b>	4,27E-01	1,16E-02	YWHAE
<b><math>\alpha</math>-Adrenergic Signaling</b>	4,23E-01	1,15E-02	Calm1 (includes others)
<b>Neuregulin Signaling</b>	4,19E-01	1,14E-02	SRC
<b>G Beta Gamma Signaling</b>	4,19E-01	1,14E-02	SRC
<b>Altered T Cell and B Cell Signaling in Rheumatoid Arthritis</b>	4,19E-01	1,14E-02	IL18
<b>PAK Signaling</b>	4,15E-01	1,12E-02	CASP3
<b>Communication between Innate and Adaptive Immune Cells</b>	4,08E-01	1,1E-02	IL18
<b>Factors Promoting Cardiogenesis in Vertebrates</b>	4,04E-01	1,09E-02	MYH7
<b>PPAR Signaling</b>	3,97E-01	1,06E-02	IL18
<b>Protein Ubiquitination Pathway</b>	3,94E-01	7,84E-03	CRYAB,HSPD1
<b>Glioma Signaling</b>	3,93E-01	1,05E-02	Calm1 (includes others)
<b>G-Protein Coupled Receptor Signaling</b>	3,92E-01	7,81E-03	SRC,RGS16
<b>IGF-1 Signaling</b>	3,86E-01	1,03E-02	YWHAE
<b>T Cell Receptor Signaling</b>	3,86E-01	1,03E-02	Calm1 (includes others)
<b>Nitric Oxide Signaling in the Cardiovascular System</b>	3,8E-01	1,01E-02	Calm1 (includes others)
<b>fMLP Signaling in Neutrophils</b>	3,52E-01	9,26E-03	Calm1 (includes others)
<b>iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells</b>	3,52E-01	9,26E-03	Calm1 (includes others)

<b>Gas Signaling</b>	3,49E-01	9,17E-03	SRC
<b>Corticotropin Releasing Hormone Signaling</b>	3,43E-01	9,01E-03	Calm1 (includes others)
<b>IL-6 Signaling</b>	3,29E-01	8,62E-03	IL18
<b>CCR3 Signaling in Eosinophils</b>	3,26E-01	8,55E-03	Calm1 (includes others)
<b>Gα12/13 Signaling</b>	3,26E-01	8,55E-03	SRC
<b>p38 MAPK Signaling</b>	3,26E-01	8,55E-03	IL18
<b>CD28 Signaling in T Helper Cells</b>	3,24E-01	8,47E-03	Calm1 (includes others)
<b>PTEN Signaling</b>	3,24E-01	8,47E-03	CASP3
<b>P2Y Purigenic Receptor Signaling Pathway</b>	3,21E-01	8,4E-03	PDIA3
<b>HMGB1 Signaling</b>	3,18E-01	8,33E-03	IL18
<b>Gai Signaling</b>	3,18E-01	8,33E-03	SRC
<b>LXR/RXR Activation</b>	3,16E-01	8,26E-03	IL18
<b>Atherosclerosis Signaling</b>	3,11E-01	8,13E-03	IL18
<b>PI3K/AKT Signaling</b>	3,11E-01	8,13E-03	YWHAE
<b>FXR/RXR Activation</b>	3,01E-01	7,87E-03	IL18
<b>Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses</b>	3,01E-01	7,87E-03	IL18
<b>Estrogen Receptor Signaling</b>	3,01E-01	7,87E-03	SRC
<b>GNRH Signaling</b>	2,96E-01	7,75E-03	SRC
<b>Ovarian Cancer Signaling</b>	2,92E-01	7,63E-03	SRC
<b>AMPK Signaling</b>	2,85E-01	7,46E-03	SRC
<b>IL-12 Signaling and Production in Macrophages</b>	2,83E-01	7,41E-03	IL18
<b>Synaptic Long Term Depression</b>	2,7E-01	7,09E-03	PDIA3
<b>CXCR4 Signaling</b>	2,49E-01	6,58E-03	SRC
<b>Hepatic Cholestasis</b>	2,31E-01	6,17E-03	IL18
<b>Molecular Mechanisms of Cancer</b>	2,28E-01	5,48E-03	SRC,CASP3
<b>Cdc42 Signaling</b>	2,23E-01	5,99E-03	SRC
<b>Wnt/β-catenin Signaling</b>	2,2E-01	5,92E-03	SRC



<b>Role of NFAT in Regulation of the Immune Response</b>	2,17E-01	5,85E-03	Calm1 (includes others)
<b>NF-κB Signaling</b>	2,14E-01	5,78E-03	IL18
<b>Ephrin Receptor Signaling</b>	2,12E-01	5,75E-03	SRC
<b>RAR Activation</b>	2,09E-01	5,68E-03	SRC
<b>B Cell Receptor Signaling</b>	2,09E-01	5,68E-03	Calm1 (includes others)
<b>Granulocyte Adhesion and Diapedesis</b>	2,08E-01	5,65E-03	IL18

**Πίνακας Παραρτήματος 4:** Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται οι διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες στα SHR 20 εβδομάδων όπως προέκυψαν από το Ingenuity Pathways Analysis

Ingenuity Canonical Pathways	$-\log(p\text{-value})$	Ratio	Molecules
<b>Ethanol Degradation IV</b>	8,92E00	3,33E-01	Aldh1a7,ALDH9A1,ALDH1A1,CAT,ALDH2,ALDH4A1
<b>TCA Cycle II (Eukaryotic)</b>	8,2E00	2,61E-01	DLD,FH,SDHA,DLST,ACO2,SUCLA2
<b>Glycolysis I</b>	7,96E00	2,4E-01	ENO3,PGK1,ALDOC,GAPDH,ALDOA,ENO1
<b>Gluconeogenesis I</b>	7,96E00	2,4E-01	ENO3,PGK1,ALDOC,GAPDH,ALDOA,ENO1
<b>Histamine Degradation</b>	7,87E00	3,85E-01	Aldh1a7,ALDH9A1,ALDH1A1,ALDH2,ALDH4A1
<b>Remodeling of Epithelial Adherens Junctions</b>	7,85E00	1,18E-01	TUBB2A,SRC,TUBB3,TUBB,TUBB2B,TUBA1C,TUBB4B,ACTG2
<b>Epithelial Adherens Junction Signaling</b>	7,39E00	6,85E-02	TUBB2A,EGF,MYH7,SRC,TUBB3,TUBB,TUBB2B,TUBA1C,TUBB4B,ACTG2
<b>Fatty Acid <math>\alpha</math>-oxidation</b>	7,35E00	3,12E-01	Aldh1a7,ALDH9A1,ALDH1A1,ALDH2,ALDH4A1
<b>Oxidative Ethanol Degradation III</b>	7,35E00	3,12E-01	Aldh1a7,ALDH9A1,ALDH1A1,ALDH2,ALDH4A1
<b>Putrescine Degradation III</b>	7,2E00	2,94E-01	Aldh1a7,ALDH9A1,ALDH1A1,ALDH2,ALDH4A1
<b>14-3-3-mediated Signaling</b>	7,13E00	7,69E-02	TUBB2A,VIM,SRC,TUBB3,TUBB,TUBB2B,TUBA1C,YWHAE,TUBB4B
<b>Tryptophan Degradation X (Mammalian, via Tryptamine)</b>	7,06E00	2,78E-01	Aldh1a7,ALDH9A1,ALDH1A1,ALDH2,ALDH4A1
<b>Sucrose Degradation V (Mammalian)</b>	6,67E00	4,44E-01	DAK,KHK,ALDOC,ALDOA
<b>Dopamine Degradation</b>	6,38E00	2,08E-01	Aldh1a7,ALDH9A1,ALDH1A1,ALDH2,ALDH4A1
<b>Gap Junction Signaling</b>	6,09E00	5,81E-02	TUBB2A,EGF,SRC,TUBB3,TUBB,TUBB2B,TUBA1C,TUBB4B,ACTG2
<b>Fatty Acid <math>\beta</math>-oxidation I</b>	5,87E00	1,67E-01	ACAA2,HADH,IVD,HADHB,ACADM
<b>Ethanol Degradation II</b>	5,65E00	1,52E-01	Aldh1a7,ALDH9A1,ALDH1A1,ALDH2,ALDH4A1
<b>Noradrenaline and Adrenaline Degradation</b>	5,52E00	1,43E-01	Aldh1a7,ALDH9A1,ALDH1A1,ALDH2,ALDH4A1
<b>Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling</b>	4,99E00	5E-02	TUBB2A,SRC,TUBB3,TUBB,TUBB2B,TUBA1C,TUBB4B,ACTG2
<b>Mitochondrial Dysfunction</b>	4,78E00	4,68E-02	UQCRC1,VDAC1,CYB5A,CAT,SDHA,ACO2,AIFM1,NDUFS3
<b>Sertoli Cell-Sertoli Cell Junction Signaling</b>	4,65E00	4,49E-02	TUBB2A,SRC,TUBB3,TUBB,TUBB2B,TUBA1C,TUBB4B,ACTG2
<b>Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling</b>	4,43E00	5E-02	GSTO1,ALDH9A1,SRC,ALDH1A1,Gstm3,ALDH6A1,ALDH4A1
<b>Glycine Degradation</b>	4,37E00	1E00	GAMT,GATM

<b>(Creatine Biosynthesis)</b>			
<b>Glutaryl-CoA Degradation</b>	4,37E00	2,73E-01	ACAT1,HADH,HADHB
<b>Serotonin Degradation</b>	4,35E00	8,33E-02	Aldh1a7,ALDH9A1,ALDH1A1,ALDH2,ALDH4A1
<b>Isoleucine Degradation I</b>	4,03E00	2,14E-01	DLD,ACAT1,HADHB
<b>LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function</b>	4,02E00	3,65E-02	IL18,GSTO1,ALDH9A1,ALDH1A1,Gstm3,CAT,ALDH6A1,ALDH4A1
<b>Valine Degradation I</b>	3,69E00	1,67E-01	DLD,ALDH6A1,HADHB
<b>2-ketoglutarate Dehydrogenase Complex</b>	3,6E00	5E-01	DLD,DLST
<b>Tryptophan Degradation III (Eukaryotic)</b>	3,55E00	1,5E-01	ACAT1,HADH,HADHB
<b>Lysine Degradation II</b>	3,38E00	4E-01	AASS,AADAT
<b>Arginine Biosynthesis IV</b>	3,21E00	3,33E-01	GLUD1,ASS1
<b>Superoxide Radicals Degradation</b>	3,21E00	3,33E-01	SOD1,CAT
<b>Acetyl-CoA Biosynthesis I (Pyruvate Dehydrogenase Complex)</b>	3,06E00	2,86E-01	DLAT,DLD
<b>NRF2-mediated Oxidative Stress Response</b>	2,93E00	3,33E-02	GSTO1,SOD1,Gstm3,CAT,EPHX1,ACTG2
<b>LXR/RXR Activation</b>	2,93E00	4,13E-02	IL18,TF,HADH,HPX,ALB
<b>Caveolar-mediated Endocytosis Signaling</b>	2,9E00	5,56E-02	EGF,SRC,ACTG2,ALB
<b>Leucine Degradation I</b>	2,83E00	2,22E-01	IVD,ACADM
<b>Ketolysis</b>	2,83E00	2,22E-01	ACAT1,HADHB
<b>Breast Cancer Regulation by Stathmin1</b>	2,8E00	3,14E-02	TUBB2A,TUBB3,TUBB,TUBB2B,TUBA1C,TUBB4B
<b>Ketogenesis</b>	2,74E00	2E-01	ACAT1,HADHB
<b>Xenobiotic Metabolism Signaling</b>	2,69E00	2,58E-02	GSTO1,ALDH9A1,ALDH1A1,Gstm3,CAT,ALDH6A1,ALDH4A1
<b>Oleate Biosynthesis II (Animals)</b>	2,5E00	1,54E-01	CYB5A,ALDH6A1
<b>Mevalonate Pathway I</b>	2,5E00	1,54E-01	ACAT1,HADHB
<b>Amyotrophic Lateral Sclerosis Signaling</b>	2,41E00	4,08E-02	GLUL,SOD1,CAT,NEFL
<b>Unfolded protein response</b>	2,28E00	5,56E-02	HSPA9,HSPA5,P4HB
<b>Superpathway of Geranylgeranyldiphosphate Biosynthesis I (via Mevalonate)</b>	2,27E00	1,18E-01	ACAT1,HADHB
<b>Oxidative Phosphorylation</b>	2,25E00	3,67E-02	UQCRC1,CYB5A,SDHA,NDUFS3
<b>Glutamine Biosynthesis</b>	2,19E00	1E00	GLUL

<b>I</b>			
<b>Sorbitol Degradation I</b>	2,19E00	1E00	SORD
<b>Sulfite Oxidation IV</b>	2,19E00	1E00	SUOX
<b>Clathrin-mediated Endocytosis Signaling</b>	2,13E00	2,7E-02	EGF,SRC,TF,ACTG2,ALB
<b>Axonal Guidance Signaling</b>	2,12E00	1,85E-02	TUBB2A,EGF,TUBB3,TUBB,SHANK2,TUBB2B,TUBA1C,TUBB4B
<b>ERK5 Signaling</b>	2,09E00	4,76E-02	EGF,SRC,YWHAE
<b>Maturity Onset Diabetes of Young (MODY) Signaling</b>	2,05E00	9,09E-02	GAPDH,PDX1
<b>FXR/RXR Activation</b>	2,02E00	3,15E-02	IL18,TF,HPX,ALB
<b><math>\beta</math>-alanine Degradation I</b>	1,89E00	5E-01	ALDH6A1
<b>Glycine Biosynthesis III</b>	1,89E00	5E-01	AGXT2
<b>Proline Degradation</b>	1,89E00	5E-01	ALDH4A1
<b>4-hydroxyproline Degradation I</b>	1,89E00	5E-01	ALDH4A1
<b>Glutamate Biosynthesis II</b>	1,89E00	5E-01	GLUD1
<b>Glutamate Degradation X</b>	1,89E00	5E-01	GLUD1
<b>Superpathway of Cholesterol Biosynthesis</b>	1,85E00	7,14E-02	ACAT1,HADHB
<b>Glutathione-mediated Detoxification</b>	1,79E00	6,67E-02	GSTO1,Gstm3
<b>Superpathway of Methionine Degradation</b>	1,73E00	6,25E-02	DLD,SUOX
<b>FAK Signaling</b>	1,71E00	3,45E-02	EGF,SRC,ACTG2
<b>L-carnitine Biosynthesis</b>	1,71E00	3,33E-01	ALDH9A1
<b>NADH Repair</b>	1,71E00	3,33E-01	GAPDH
<b>Ascorbate Recycling (Cytosolic)</b>	1,71E00	3,33E-01	GSTO1
<b>4-aminobutyrate Degradation I</b>	1,71E00	3,33E-01	SUCLG2
<b>VEGF Signaling</b>	1,66E00	3,3E-02	SRC,YWHAE,ACTG2
<b>Acute Phase Response Signaling</b>	1,61E00	2,37E-02	IL18,TF,HPX,ALB
<b>Arsenate Detoxification I (Glutaredoxin)</b>	1,59E00	2,5E-01	GSTO1
<b>Creatine-phosphate Biosynthesis</b>	1,59E00	2,5E-01	CKMT1A/CKMT1B
<b>Branched-chain <math>\alpha</math>-keto acid Dehydrogenase Complex</b>	1,59E00	2,5E-01	DLD
<b>Phenylethylamine Degradation I</b>	1,59E00	2,5E-01	ALDH2
<b>Arginine Degradation I (Arginase Pathway)</b>	1,59E00	2,5E-01	ALDH4A1
<b>Mechanisms of Viral Exit from Host Cells</b>	1,53E00	4,88E-02	LMNB2,ACTG2
<b>Lysine Degradation V</b>	1,49E00	2E-01	AADAT
<b>2-oxobutanoate Degradation I</b>	1,49E00	2E-01	DLD

<b>Citrulline-Nitric Oxide Cycle</b>	1,49E00	2E-01	ASS1
<b>Glutamate Degradation III (via 4-aminobutyrate)</b>	1,49E00	2E-01	SUCLG2
<b>Pyruvate Fermentation to Lactate</b>	1,41E00	1,67E-01	LDHB
<b>Urea Cycle</b>	1,41E00	1,67E-01	ASS1
<b>Pentose Phosphate Pathway (Non-oxidative Branch)</b>	1,41E00	1,67E-01	TKT
<b>Glycine Cleavage Complex</b>	1,41E00	1,67E-01	DLD
<b>Atherosclerosis Signaling</b>	1,33E00	2,44E-02	PRDX6,IL18,ALB
<b>EGF Signaling</b>	1,29E00	3,57E-02	EGF,SRC
<b>Regulation of Cellular Mechanics by Calpain Protease</b>	1,27E00	3,51E-02	EGF,SRC
<b>Estrogen-Dependent Breast Cancer Signaling</b>	1,21E00	3,23E-02	SRC,HSD17B1
<b>Huntington's Disease Signaling</b>	1,19E00	1,74E-02	EGF,HSPA9,HSPA5,SDHA
<b>Pentose Phosphate Pathway</b>	1,16E00	9,09E-02	TKT
<b>Macropinocytosis Signaling</b>	1,14E00	2,94E-02	EGF,SRC
<b>Agrin Interactions at Neuromuscular Junction</b>	1,13E00	2,9E-02	SRC,ACTG2
<b>Guanosine Nucleotides Degradation III</b>	1,09E00	7,69E-02	GDA
<b>Superpathway of Citrulline Metabolism</b>	1,06E00	7,14E-02	ASS1
<b>Phenylalanine Degradation IV (Mammalian, via Side Chain)</b>	1,06E00	7,14E-02	ALDH2
<b>Vitamin-C Transport</b>	1,06E00	7,14E-02	GSTO1
<b>Methylglyoxal Degradation III</b>	1,03E00	6,67E-02	AKR1B1
<b>Granzyme B Signaling</b>	1E00	6,25E-02	LMNB2
<b><math>\gamma</math>-linolenate Biosynthesis II (Animals)</b>	9,78E-01	5,88E-02	CYB5A
<b>Calcium Signaling</b>	9,56E-01	1,69E-02	Tpm4,MYH7,Tpm3
<b>Glutathione Redox Reactions I</b>	9,54E-01	5,56E-02	PRDX6
<b>Neuregulin Signaling</b>	9,49E-01	2,27E-02	EGF,SRC
<b>Virus Entry via Endocytic Pathways</b>	9,41E-01	2,25E-02	SRC,ACTG2
<b>Crosstalk between Dendritic Cells and</b>	9,41E-01	2,25E-02	IL18,ACTG2

<b>Natural Killer Cells</b>			
<b>Apoptosis Signaling</b>	9,41E-01	2,25E-02	AIFM1,LMNA
<b>Death Receptor Signaling</b>	9,17E-01	2,17E-02	LMNA,ACTG2
<b>ILK Signaling</b>	9,14E-01	1,61E-02	VIM,MYH7,ACTG2
<b>Cardiomyocyte Differentiation via BMP Receptors</b>	9,11E-01	5E-02	MYH7
<b>Granzyme A Signaling</b>	9,11E-01	5E-02	HIST1H1C
<b>Purine Nucleotides Degradation II (Aerobic)</b>	9,11E-01	5E-02	GDA
<b>Fcy Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes</b>	9,09E-01	2,15E-02	SRC,ACTG2
<b>Agranulocyte Adhesion and Diapedesis</b>	8,99E-01	1,59E-02	IL18,MYH7,ACTG2
<b>Endoplasmic Reticulum Stress Pathway</b>	8,91E-01	4,76E-02	HSPA5
<b>Antioxidant Action of Vitamin C</b>	8,8E-01	2,06E-02	PRDX6,GSTO1
<b>Cholecystokinin/Gastrin-mediated Signaling</b>	8,51E-01	1,98E-02	IL18,SRC
<b>Paxillin Signaling</b>	8,45E-01	1,96E-02	SRC,ACTG2
<b>Tumoricidal Function of Hepatic Natural Killer Cells</b>	8,38E-01	4,17E-02	AIFM1
<b>Triacylglycerol Degradation</b>	8,38E-01	4,17E-02	PRDX6
<b>Role of Tissue Factor in Cancer</b>	7,93E-01	1,82E-02	SRC,P4HB
<b>Actin Cytoskeleton Signaling</b>	7,73E-01	1,38E-02	EGF,MYH7,ACTG2
<b>p70S6K Signaling</b>	7,4E-01	1,68E-02	SRC,YWHAE
<b>Retinoate Biosynthesis I</b>	7,12E-01	3,03E-02	ALDH1A1
<b>Signaling by Rho Family GTPases</b>	7,07E-01	1,28E-02	VIM,DES,ACTG2
<b>Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)</b>	6,87E-01	1,55E-02	MYH7,ACTG2
<b>GNRH Signaling</b>	6,87E-01	1,55E-02	EGF,SRC
<b>Ovarian Cancer Signaling</b>	6,77E-01	1,53E-02	EGF,SRC
<b>Estrogen Biosynthesis</b>	6,67E-01	2,7E-02	HSD17B1
<b>AMPK Signaling</b>	6,62E-01	1,49E-02	SRC,PPM1B
<b>IL-12 Signaling and Production in</b>	6,58E-01	1,48E-02	IL18,ALB

<b>Macrophages</b>			
<b>tRNA Charging</b>	6,47E-01	2,56E-02	RARS
<b>Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease</b>	6,38E-01	2,5E-02	YWHAE
<b>eNOS Signaling</b>	6,3E-01	1,42E-02	HSPA9,HSPA5
<b>UVC-Induced MAPK Signaling</b>	6,19E-01	2,38E-02	SRC
<b>Glioblastoma Multiforme Signaling</b>	6,08E-01	1,37E-02	EGF,SRC
<b>Role of Hypercytokinemia/hyperchemokine in the Pathogenesis of Influenza</b>	5,93E-01	2,22E-02	IL18
<b>Role of Oct4 in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency</b>	5,85E-01	2,17E-02	PHB
<b>MSP-RON Signaling Pathway</b>	5,85E-01	2,17E-02	ACTG2
<b>Aldosterone Signaling in Epithelial Cells</b>	5,84E-01	1,32E-02	HSPA9,HSPA5
<b>Graft-versus-Host Disease Signaling</b>	5,69E-01	2,08E-02	IL18
<b>Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation</b>	5,61E-01	2,04E-02	YWHAE
<b>Tec Kinase Signaling</b>	5,6E-01	1,27E-02	SRC,ACTG2
<b>Heparan Sulfate Biosynthesis (Late Stages)</b>	5,54E-01	2E-02	PRDX6
<b>Tight Junction Signaling</b>	5,27E-01	1,2E-02	MYH7,ACTG2
<b>Endothelin-1 Signaling</b>	5,13E-01	1,17E-02	PRDX6,SRC
<b>Role of Cytokines in Mediating Communication between Immune Cells</b>	5,13E-01	1,79E-02	IL18
<b>RhoGDI Signaling</b>	5,07E-01	1,16E-02	SRC,ACTG2
<b>NF-κB Signaling</b>	5,07E-01	1,16E-02	EGF,IL18
<b>Heparan Sulfate Biosynthesis</b>	5,06E-01	1,75E-02	PRDX6
<b>Phospholipases</b>	5,06E-01	1,75E-02	PRDX6
<b>Glutamate Receptor Signaling</b>	5,06E-01	1,75E-02	GLUL
<b>Ephrin Receptor Signaling</b>	5,03E-01	1,15E-02	EGF,SRC
<b>Myc Mediated Apoptosis Signaling</b>	5E-01	1,72E-02	YWHAE
<b>RAR Activation</b>	4,97E-01	1,14E-02	SRC,ALDH1A1

	01		
<b>Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages</b>	4,84E-01	1,11E-02	CAT,ALB
<b>IL-8 Signaling</b>	4,74E-01	1,09E-02	EGF,SRC
<b>Antiproliferative Role of Somatostatin Receptor 2</b>	4,71E-01	1,59E-02	SRC
<b>Eicosanoid Signaling</b>	4,71E-01	1,59E-02	PRDX6
<b>Non-Small Cell Lung Cancer Signaling</b>	4,6E-01	1,54E-02	EGF
<b>Hypoxia Signaling in the Cardiovascular System</b>	4,6E-01	1,54E-02	P4HB
<b>Thrombin Signaling</b>	4,51E-01	1,05E-02	EGF,SRC
<b>PXR/RXR Activation</b>	4,49E-01	1,49E-02	ALDH1A1
<b>Erythropoietin Signaling</b>	4,49E-01	1,49E-02	SRC
<b>GABA Receptor Signaling</b>	4,49E-01	1,49E-02	ALDH9A1
<b>IL-10 Signaling</b>	4,44E-01	1,47E-02	IL18
<b>Role of MAPK Signaling in the Pathogenesis of Influenza</b>	4,44E-01	1,47E-02	PRDX6
<b>Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation</b>	4,34E-01	1,02E-02	EGF,MYH7
<b>Leukocyte Extravasation Signaling</b>	4,31E-01	1,01E-02	SRC,ACTG2
<b>T Helper Cell Differentiation</b>	4,29E-01	1,41E-02	IL18
<b>Renal Cell Carcinoma Signaling</b>	4,29E-01	1,41E-02	FH
<b>Chemokine Signaling</b>	4,29E-01	1,41E-02	SRC
<b>Integrin Signaling</b>	4,2E-01	9,9E-03	SRC,ACTG2
<b>STAT3 Pathway</b>	4,2E-01	1,37E-02	SRC
<b>Toll-like Receptor Signaling</b>	4,15E-01	1,35E-02	IL18
<b>TREM1 Signaling</b>	4,11E-01	1,33E-02	IL18
<b>HER-2 Signaling in Breast Cancer</b>	4,06E-01	1,32E-02	EGF
<b>PDGF Signaling</b>	4,02E-01	1,3E-02	SRC
<b>Reelin Signaling in Neurons</b>	3,94E-01	1,27E-02	SRC
<b>Role of Osteoblasts,</b>	3,78E-	9,13E-03	IL18,SRC



<b>Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis</b>	01		
<b>Melanocyte Development and Pigmentation Signaling</b>	3,73E-01	1,19E-02	SRC
<b>TR/RXR Activation</b>	3,69E-01	1,18E-02	ENO1
<b>ErbB Signaling</b>	3,66E-01	1,16E-02	EGF
<b>HIPPO signaling</b>	3,66E-01	1,16E-02	YWHAE
<b>Bladder Cancer Signaling</b>	3,62E-01	1,15E-02	EGF
<b>G Beta Gamma Signaling</b>	3,58E-01	1,14E-02	SRC
<b>Altered T Cell and B Cell Signaling in Rheumatoid Arthritis</b>	3,58E-01	1,14E-02	IL18
<b>RANK Signaling in Osteoclasts</b>	3,58E-01	1,14E-02	SRC
<b>Regulation of Actin-based Motility by Rho</b>	3,47E-01	1,1E-02	ACTG2
<b>Communication between Innate and Adaptive Immune Cells</b>	3,47E-01	1,1E-02	IL18
<b>Factors Promoting Cardiogenesis in Vertebrates</b>	3,44E-01	1,09E-02	MYH7
<b>Colorectal Cancer Metastasis Signaling</b>	3,4E-01	8,47E-03	EGF,SRC
<b>PPAR Signaling</b>	3,37E-01	1,06E-02	IL18
<b>Protein Kinase A Signaling</b>	3,35E-01	7,77E-03	HIST1H1C,YWHAE,DUSP22
<b>Glioma Signaling</b>	3,34E-01	1,05E-02	EGF
<b>IGF-1 Signaling</b>	3,27E-01	1,03E-02	YWHAE
<b>Telomerase Signaling</b>	3,21E-01	1,01E-02	EGF
<b>Neuropathic Pain Signaling In Dorsal Horn Neurons</b>	3,18E-01	1E-02	SRC
<b>HIF1<math>\alpha</math> Signaling</b>	3,12E-01	9,8E-03	LDHB
<b>Protein Ubiquitination Pathway</b>	3,04E-01	7,84E-03	HSPA9,HSPA5
<b>Pancreatic Adenocarcinoma Signaling</b>	3E-01	9,43E-03	EGF
<b>Glucocorticoid Receptor Signaling</b>	2,93E-01	7,66E-03	HSPA9,HSPA5
<b>Gas Signaling</b>	2,92E-01	9,17E-03	SRC

<b>Androgen Signaling</b>	2,86E-01	9,01E-03	SRC
<b>IL-6 Signaling</b>	2,73E-01	8,62E-03	IL18
<b>Type II Diabetes Mellitus Signaling</b>	2,71E-01	8,55E-03	PDX1
<b>Gα12/13 Signaling</b>	2,71E-01	8,55E-03	SRC
<b>p38 MAPK Signaling</b>	2,71E-01	8,55E-03	IL18
<b>HMGB1 Signaling</b>	2,64E-01	8,33E-03	IL18
<b>Gai Signaling</b>	2,64E-01	8,33E-03	SRC
<b>Sperm Motility</b>	2,64E-01	8,33E-03	PRDX6
<b>RhoA Signaling</b>	2,59E-01	8,2E-03	ACTG2
<b>PI3K/AKT Signaling</b>	2,57E-01	8,13E-03	YWHAE
<b>Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses</b>	2,48E-01	7,87E-03	IL18
<b>Estrogen Receptor Signaling</b>	2,48E-01	7,87E-03	SRC
<b>Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis</b>	2,36E-01	6,71E-03	IL18,SRC
<b>Synaptic Long Term Depression</b>	2,19E-01	7,09E-03	PRDX6
<b>CXCR4 Signaling</b>	2E-01	6,58E-03	SRC

**Πίνακας Παραρτήματος 5:** Διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στα SHR ζώα 6 εβδομάδων όπως προέκυψε από την ανάλυση του νεφρικού παρεγχύματος με LC-MS/MS. Το στατιστικό τεστ Mann-Whitney χρησιμοποιήθηκε. Όλες οι τιμές είναι στατιστικά σημαντικές με  $p < 0.05$

Κωδικός	Πρωτεΐνη	Λόγος Έκφρασης (SHR/WKY)
<b>Q5I0J9</b>	Putative L-aspartate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Aspdh PE=2 SV=1 - [ASPD_RAT]	52,9227889
<b>P10818</b>	Cytochrome c oxidase subunit 6A1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cox6a1 PE=1 SV=2 - [CX6A1_RAT]	50,7008286
<b>Q6SKG1</b>	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM3, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acsm3 PE=2 SV=1 - [ACSM3_RAT]	43,3333918
<b>O89047</b>	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 3 OS=Rattus norvegicus GN=Kcnh3 PE=2 SV=1 - [KCNH3_RAT]	13,8072281
<b>P63159</b>	High mobility group protein B1 OS=Rattus norvegicus GN=Hmgb1 PE=1 SV=2 - [HMGB1_RAT]	13,3848062
<b>P53792</b>	Sodium/glucose cotransporter 2 OS=Rattus norvegicus GN=Slc5a2 PE=2 SV=1 - [SC5A2_RAT]	11,8232974
<b>P23680</b>	Serum amyloid P-component OS=Rattus norvegicus GN=Apcs PE=2 SV=2 - [SAMP_RAT]	11,7498551
<b>P50170</b>	Retinol dehydrogenase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Rdh2 PE=1 SV=1 - [RDH2_RAT]	11,66509
<b>Q9QYF3</b>	Unconventional myosin-Va OS=Rattus norvegicus GN=Myo5a PE=1 SV=1 - [MYO5A_RAT]	11,6092451
<b>Q9QZ86</b>	Nucleolar protein 58 OS=Rattus norvegicus GN=Nop58 PE=1 SV=1 - [NOP58_RAT]	10,6061608
<b>Q6AXT8</b>	Splicing factor 3A subunit 2 OS=Rattus norvegicus GN=Sf3a2 PE=2 SV=1 - [SF3A2_RAT]	10,107545
<b>O88506</b>	STE20/SPS1-related proline-alanine-rich protein kinase OS=Rattus norvegicus GN=Stk39 PE=2 SV=2 - [STK39_RAT]	9,54337674
<b>Q7TSE9</b>	HCLS1-associated protein X-1 OS=Rattus norvegicus GN=Hax1 PE=1 SV=1 - [HAX1_RAT]	8,89308091
<b>Q5XIK7</b>	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 1 OS=Rattus norvegicus GN=Katnal1 PE=2 SV=1 - [KATL1_RAT]	7,96681417
<b>P04692</b>	Tropomyosin alpha-1 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm1 PE=1 SV=3 - [TPM1_RAT]	7,71040912
<b>Q62868</b>	Rho-associated protein kinase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Rock2 PE=1 SV=2 - [ROCK2_RAT]	7,03050109
<b>Q5RJQ7</b>	Succinate dehydrogenase assembly factor 2, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Sdhaf2 PE=2 SV=1 - [SDHF2_RAT]	6,75928938

<b>Q7TQ16</b>	Cytochrome b-c1 complex subunit 8 OS=Rattus norvegicus GN=Uqcrq PE=3 SV=1 - [QCR8_RAT]	6,66033166
<b>P07632</b>	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Rattus norvegicus GN=Sod1 PE=1 SV=2 - [SODC_RAT]	6,49331383
<b>P29066</b>	Beta-arrestin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Arrb1 PE=1 SV=1 - [ARRB1_RAT]	6,46959282
<b>P04550</b>	Parathyrosin OS=Rattus norvegicus GN=Ptms PE=1 SV=2 - [PTMS_RAT]	6,3978663
<b>P18422</b>	Proteasome subunit alpha type-3 OS=Rattus norvegicus GN=Psm3 PE=1 SV=3 - [PSA3_RAT]	6,34087871
<b>Q4QQW3</b>	Hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Adhfe1 PE=1 SV=1 - [HOT_RAT]	6,31719201
<b>Q8VID1</b>	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4 OS=Rattus norvegicus GN=Dhrs4 PE=2 SV=2 - [DHRS4_RAT]	6,22925581
<b>Q5M821</b>	Protein phosphatase 1H OS=Rattus norvegicus GN=Ppm1h PE=2 SV=2 - [PPM1H_RAT]	5,99255283
<b>Q66H68</b>	RNA-binding protein 47 OS=Rattus norvegicus GN=Rbm47 PE=2 SV=1 - [RBM47_RAT]	5,97448876
<b>P97615</b>	Thioredoxin, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Txn2 PE=2 SV=1 - [THIOM_RAT]	5,94609354
<b>P84245</b>	Histone H3.3 OS=Rattus norvegicus GN=H3f3b PE=1 SV=2 - [H33_RAT]	5,77192511
<b>P41498</b>	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase OS=Rattus norvegicus GN=Acp1 PE=1 SV=3 - [PPAC_RAT]	5,69527746
<b>Q62975</b>	Protein Z-dependent protease inhibitor OS=Rattus norvegicus GN=Serpina10 PE=2 SV=2 - [ZPI_RAT]	5,6401854
<b>Q6AXQ0</b>	SUMO-activating enzyme subunit 1 OS=Rattus norvegicus GN=Sae1 PE=2 SV=1 - [SAE1_RAT]	5,57308513
<b>P12001</b>	60S ribosomal protein L18 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl18 PE=2 SV=2 - [RL18_RAT]	5,41985282
<b>Q6AXY0</b>	Glutathione S-transferase A6 OS=Rattus norvegicus GN=Gsta6 PE=1 SV=1 - [GSTA6_RAT]	5,19591939
<b>Q71LX6</b>	Xin actin-binding repeat-containing protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Xirp2 PE=1 SV=1 - [XIRP2_RAT]	5,11213143
<b>P54001</b>	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 OS=Rattus norvegicus GN=P4ha1 PE=2 SV=2 - [P4HA1_RAT]	4,7767659
<b>Q3KR59</b>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10 OS=Rattus norvegicus GN=Usp10 PE=2 SV=1 - [UBP10_RAT]	4,69837901
<b>P05765</b>	40S ribosomal protein S21 OS=Rattus norvegicus GN=Rps21 PE=1 SV=1 - [RS21_RAT]	4,58353022
<b>Q5XI31</b>	GPI transamidase component PIG-S OS=Rattus norvegicus GN=Pigs PE=2 SV=3 - [PIGS_RAT]	4,54977903
<b>Q5XI22</b>	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic OS=Rattus norvegicus GN=Acat2 PE=1 SV=1 - [THIC_RAT]	4,48766051
<b>Q2TL32</b>	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4 OS=Rattus norvegicus GN=Ubr4 PE=1 SV=2 - [UBR4_RAT]	4,37575821
<b>P29534</b>	Vascular cell adhesion protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Vcam1 PE=2 SV=1 - [VCAM1_RAT]	4,35491394

<b>P47875</b>	Cysteine and glycine-rich protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Csrp1 PE=2 SV=2 - [CSRP1_RAT]	4,34618877
<b>Q5U2X7</b>	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim21 OS=Rattus norvegicus GN=Timm21 PE=2 SV=1 - [TIM21_RAT]	4,27116314
<b>Q9ES54</b>	Nuclear protein localization protein 4 homolog OS=Rattus norvegicus GN=Nploc4 PE=1 SV=3 - [NPL4_RAT]	4,19308008
<b>D4AD37</b>	Inositol monophosphatase 3 OS=Rattus norvegicus GN=Impad1 PE=3 SV=1 - [IMPA3_RAT]	4,18700382
<b>P08460</b>	Nidogen-1 (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Nid1 PE=1 SV=2 - [NID1_RAT]	4,17886178
<b>P02401</b>	60S acidic ribosomal protein P2 OS=Rattus norvegicus GN=Rplp2 PE=1 SV=2 - [RLA2_RAT]	4,1015938
<b>P04644</b>	40S ribosomal protein S17 OS=Rattus norvegicus GN=Rps17 PE=1 SV=3 - [RS17_RAT]	4,00576281
<b>Q5FVI3</b>	Leucine-rich repeat-containing protein 57 OS=Rattus norvegicus GN=Lrrc57 PE=2 SV=1 - [LRC57_RAT]	4,00493595
<b>O70594</b>	Solute carrier family 22 member 5 OS=Rattus norvegicus GN=Slc22a5 PE=1 SV=1 - [S22A5_RAT]	3,96175127
<b>A1A5S1</b>	Pre-mRNA-processing factor 6 OS=Rattus norvegicus GN=Prpf6 PE=2 SV=1 - [PRP6_RAT]	3,96112792
<b>Q63945</b>	Protein SET OS=Rattus norvegicus GN=Set PE=2 SV=2 - [SET_RAT]	3,95570061
<b>P05369</b>	Farnesyl pyrophosphate synthase OS=Rattus norvegicus GN=Fdps PE=2 SV=2 - [FPPS_RAT]	3,95517811
<b>P22791</b>	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	3,81768344
<b>Q71UE8</b>	NEDD8 OS=Rattus norvegicus GN=Nedd8 PE=1 SV=1 - [NEDD8_RAT]	3,7895764
<b>P48284</b>	Carbonic anhydrase 4 OS=Rattus norvegicus GN=Ca4 PE=1 SV=1 - [CAH4_RAT]	3,7454602
<b>Q04462</b>	Valine--tRNA ligase OS=Rattus norvegicus GN=Vars PE=2 SV=2 - [SYVC_RAT]	3,70631137
<b>Q9Z311</b>	Trans-2-enoyl-CoA reductase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Mecr PE=1 SV=1 - [MECR_RAT]	3,65840901
<b>P47245</b>	Nardilysin OS=Rattus norvegicus GN=Nrd1 PE=2 SV=1 - [NRDC_RAT]	3,64900722
<b>P86182</b>	Coiled-coil domain-containing protein 22 OS=Rattus norvegicus GN=Ccdc22 PE=1 SV=2 - [CCD22_RAT]	3,63050623
<b>Q6PCT3</b>	Tumor protein D54 OS=Rattus norvegicus GN=Tpd52l2 PE=2 SV=1 - [TPD54_RAT]	3,58886956
<b>P24464</b>	Cytochrome P450 4A12 OS=Rattus norvegicus GN=Cyp4a12 PE=2 SV=2 - [CP4AC_RAT]	3,58069251
<b>P29117</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ppif PE=1 SV=2 - [PPIF_RAT]	3,57896225
<b>B0BNC9</b>	Quinone oxidoreductase-like protein 2 OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=1 - [QORL2_RAT]	3,56795194
<b>P47198</b>	60S ribosomal protein L22 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl22 PE=2 SV=2 - [RL22_RAT]	3,56316696

<b>P10633</b>	Cytochrome P450 2D1 OS=Rattus norvegicus GN=Cyp2d1 PE=2 SV=1 - [CP2D1_RAT]	3,53993655
<b>O55159</b>	Epithelial cell adhesion molecule OS=Rattus norvegicus GN=Epcam PE=1 SV=1 - [EPCAM_RAT]	3,51037158
<b>Q6AY63</b>	ADP-sugar pyrophosphatase OS=Rattus norvegicus GN=Nudt5 PE=2 SV=1 - [NUDT5_RAT]	3,5067413
<b>Q6PCU8</b>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ndufv3 PE=3 SV=1 - [NDUV3_RAT]	3,48533307
<b>Q812D3</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 3 OS=Rattus norvegicus GN=Ppil3 PE=2 SV=1 - [PPIL3_RAT]	3,47141624
<b>Q63009</b>	Protein arginine N-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Prmt1 PE=1 SV=1 - [ANM1_RAT]	3,42271414
<b>F1MA98</b>	Nucleoprotein TPR OS=Rattus norvegicus GN=Tpr PE=1 SV=1 - [TPR_RAT]	3,35156901
<b>P61354</b>	60S ribosomal protein L27 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl27 PE=2 SV=2 - [RL27_RAT]	3,32509151
<b>Q925S8</b>	ATP-dependent zinc metalloprotease YME1L1 OS=Rattus norvegicus GN=Yme1l1 PE=2 SV=1 - [YMEL1_RAT]	3,31447539
<b>Q5PQM2</b>	Kinesin light chain 4 OS=Rattus norvegicus GN=Klc4 PE=2 SV=1 - [KLC4_RAT]	3,28406838
<b>Q499U2</b>	Engulfment and cell motility protein 3 OS=Rattus norvegicus GN=Elmo3 PE=2 SV=1 - [ELMO3_RAT]	3,24776846
<b>Q99NA5</b>	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Idh3a PE=1 SV=1 - [IDH3A_RAT]	3,13704781
<b>P47967</b>	Galectin-5 OS=Rattus norvegicus GN=Lgals5 PE=1 SV=2 - [LEG5_RAT]	3,10446563
<b>Q6AXM8</b>	Serum paraoxonase/arylesterase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Pon2 PE=2 SV=1 - [PON2_RAT]	3,08524771
<b>B0LT89</b>	Serine/threonine-protein kinase 24 OS=Rattus norvegicus GN=Stk24 PE=2 SV=1 - [STK24_RAT]	3,07716378
<b>Q7TT49</b>	Serine/threonine-protein kinase MRCK beta OS=Rattus norvegicus GN=Cdc42bpb PE=1 SV=1 - [MRCKB_RAT]	3,05036743
<b>Q62839</b>	Golgin subfamily A member 2 OS=Rattus norvegicus GN=Golga2 PE=1 SV=3 - [GOGA2_RAT]	3,04990178
<b>Q7TNK6</b>	tRNA (guanine(10)-N2)-methyltransferase homolog OS=Rattus norvegicus GN=Trmt11 PE=2 SV=1 - [TRM11_RAT]	3,00103407
<b>O54861</b>	Sortilin OS=Rattus norvegicus GN=Sort1 PE=1 SV=3 - [SORT_RAT]	2,94934344
<b>Q9WV97</b>	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9 OS=Rattus norvegicus GN=Timm9 PE=1 SV=3 - [TIM9_RAT]	2,92906639
<b>Q5I0E9</b>	Multidrug and toxin extrusion protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Slc47a1 PE=1 SV=1 - [S47A1_RAT]	2,92448597
<b>P54319</b>	Phospholipase A-2-activating protein OS=Rattus norvegicus GN=Plaa PE=2 SV=3 - [PLAP_RAT]	2,92395734

<b>P35738</b>	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Bckdhh PE=1 SV=3 - [ODBB_RAT]	2,87661923
<b>P23928</b>	Alpha-crystallin B chain OS=Rattus norvegicus GN=Cryab PE=1 SV=1 - [CRYAB_RAT]	2,86557234
<b>P10111</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Rattus norvegicus GN=Ppia PE=1 SV=2 - [PIIA_RAT]	2,84622403
<b>Q6P791</b>	Ragulator complex protein LAMTOR1 OS=Rattus norvegicus GN=Lamtor1 PE=1 SV=1 - [LTOR1_RAT]	2,84209484
<b>P63326</b>	40S ribosomal protein S10 OS=Rattus norvegicus GN=Rps10 PE=2 SV=1 - [RS10_RAT]	2,83492625
<b>P00173</b>	Cytochrome b5 OS=Rattus norvegicus GN=Cyb5a PE=1 SV=2 - [CYB5_RAT]	2,83207064
<b>P01048</b>	T-kininogen 1 OS=Rattus norvegicus GN=Map1 PE=1 SV=2 - [KNT1_RAT]	2,81081876
<b>P53565</b>	Homeobox protein cut-like 1 OS=Rattus norvegicus GN=Cux1 PE=1 SV=2 - [CUX1_RAT]	2,79486481
<b>P02770</b>	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	2,77661179
<b>Q91ZW1</b>	Transcription factor A, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Tfam PE=2 SV=1 - [TFAM_RAT]	2,77103533
<b>Q62780</b>	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46 OS=Rattus norvegicus GN=Ddx46 PE=1 SV=1 - [DDX46_RAT]	2,76640328
<b>Q9WVK3</b>	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase OS=Rattus norvegicus GN=Pecr PE=2 SV=1 - [PECR_RAT]	2,76244139
<b>P00564</b>	Creatine kinase M-type OS=Rattus norvegicus GN=Ckm PE=1 SV=2 - [KCRM_RAT]	2,7259865
<b>P22509</b>	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin OS=Rattus norvegicus GN=Fbl PE=1 SV=2 - [FBRL_RAT]	2,71332218
<b>Q10758</b>	Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Rattus norvegicus GN=Krt8 PE=1 SV=3 - [K2C8_RAT]	2,71250731
<b>Q66HC5</b>	Nuclear pore complex protein Nup93 OS=Rattus norvegicus GN=Nup93 PE=1 SV=1 - [NUP93_RAT]	2,70436474
<b>P53042</b>	Serine/threonine-protein phosphatase 5 OS=Rattus norvegicus GN=Ppp5c PE=1 SV=1 - [PPP5_RAT]	2,65334904
<b>O08701</b>	Arginase-2, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Arg2 PE=2 SV=1 - [ARGI2_RAT]	2,6363206
<b>B5DFC8</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C OS=Rattus norvegicus GN=Eif3c PE=2 SV=1 - [EIF3C_RAT]	2,63115168
<b>Q6PEC0</b>	Bis(5'-nucleosyl)-tetraphosphatase [asymmetrical] OS=Rattus norvegicus GN=Nudt2 PE=2 SV=3 - [AP4A_RAT]	2,62933402
<b>P13086</b>	Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Suclg1 PE=2 SV=2 - [SUCA_RAT]	2,62504297
<b>Q62645</b>	Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2D OS=Rattus norvegicus GN=Grin2d PE=1 SV=2 - [NMDE4_RAT]	2,59863903
<b>Q5U2U0</b>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Clpx	2,577169

	PE=2 SV=1 - [CLPX_RAT]	
<b>P10687</b>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1 OS=Rattus norvegicus GN=Plcb1 PE=1 SV=1 - [PLCB1_RAT]	2,57059922
<b>P55016</b>	Solute carrier family 12 member 1 OS=Rattus norvegicus GN=Slc12a1 PE=1 SV=1 - [S12A1_RAT]	2,56657768
<b>Q5BJS0</b>	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30 OS=Rattus norvegicus GN=Dhx30 PE=1 SV=1 - [DHX30_RAT]	2,55947332
<b>P07379</b>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP] OS=Rattus norvegicus GN=Pck1 PE=1 SV=1 - [PCKGC_RAT]	2,54046265
<b>Q9Z0V5</b>	Peroxiredoxin-4 OS=Rattus norvegicus GN=Prdx4 PE=2 SV=1 - [PRDX4_RAT]	2,54020393
<b>P97690</b>	Structural maintenance of chromosomes protein 3 OS=Rattus norvegicus GN=Smc3 PE=1 SV=1 - [SMC3_RAT]	2,53874321
<b>Q63610</b>	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm3 PE=1 SV=2 - [TPM3_RAT]	2,53456007
<b>P35427</b>	60S ribosomal protein L13a OS=Rattus norvegicus GN=Rpl13a PE=1 SV=2 - [RL13A_RAT]	2,52397165
<b>P62919</b>	60S ribosomal protein L8 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl8 PE=2 SV=2 - [RL8_RAT]	2,52290502
<b>Q9QYL8</b>	Acyl-protein thioesterase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Lypla2 PE=1 SV=1 - [LYPA2_RAT]	2,52103779
<b>Q5BK17</b>	Iodotyrosine dehalogenase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Iyd PE=2 SV=1 - [IYD1_RAT]	2,51924279
<b>Q9Z1M9</b>	Structural maintenance of chromosomes protein 1A OS=Rattus norvegicus GN=Smc1a PE=1 SV=1 - [SMC1A_RAT]	2,51066003
<b>Q920F5</b>	Malonyl-CoA decarboxylase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Mlycd PE=1 SV=1 - [DCMC_RAT]	2,49812354
<b>P04916</b>	Retinol-binding protein 4 OS=Rattus norvegicus GN=Rbp4 PE=1 SV=1 - [RET4_RAT]	2,48349706
<b>Q68A21</b>	Transcriptional activator protein Pur-beta OS=Rattus norvegicus GN=Purb PE=1 SV=3 - [PURB_RAT]	2,47879027
<b>Q6AYH6</b>	ER membrane protein complex subunit 10 OS=Rattus norvegicus GN=Emc10 PE=1 SV=1 - [EMC10_RAT]	2,45103376
<b>P97834</b>	COP9 signalosome complex subunit 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gps1 PE=1 SV=1 - [CSN1_RAT]	2,44829902
<b>Q4QQW4</b>	Histone deacetylase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Hdac1 PE=1 SV=1 - [HDAC1_RAT]	2,43982226
<b>Q62835</b>	Rab GTPase-binding effector protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Rabep2 PE=2 SV=1 - [RABE2_RAT]	2,42528551
<b>Q5U4E6</b>	Golgin subfamily A member 4 OS=Rattus norvegicus GN=Golga4 PE=1 SV=2 - [GOGA4_RAT]	2,41282726
<b>P62997</b>	Transformer-2 protein homolog beta OS=Rattus norvegicus GN=Tra2b PE=1 SV=1 - [TRA2B_RAT]	2,40857048
<b>Q62696</b>	Disks large homolog 1 OS=Rattus norvegicus GN=Dlg1 PE=1 SV=1 - [DLG1_RAT]	2,40088529



<b>P08649</b>	Complement C4 OS=Rattus norvegicus GN=C4 PE=1 SV=3 - [CO4_RAT]	2,39886357
<b>P97700</b>	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein OS=Rattus norvegicus GN=Slc25a11 PE=2 SV=3 - [M2OM_RAT]	2,39434062
<b>Q91ZN1</b>	Coronin-1A OS=Rattus norvegicus GN=Coro1a PE=1 SV=3 - [COR1A_RAT]	2,39248552
<b>Q91XU8</b>	Phosphatidate cytidylyltransferase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Cds2 PE=2 SV=1 - [CDS2_RAT]	2,37294147
<b>Q5XI81</b>	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Fxr1 PE=2 SV=1 - [FXR1_RAT]	2,37234638
<b>P30839</b>	Fatty aldehyde dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Aldh3a2 PE=1 SV=1 - [AL3A2_RAT]	2,35513932
<b>P18421</b>	Proteasome subunit beta type-1 OS=Rattus norvegicus GN=Psm1 PE=1 SV=3 - [PSB1_RAT]	2,34614071
<b>P63004</b>	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha OS=Rattus norvegicus GN=Pafah1b1 PE=1 SV=2 - [LIS1_RAT]	2,34572116
<b>Q5XFW8</b>	Protein SEC13 homolog OS=Rattus norvegicus GN=Sec13 PE=1 SV=1 - [SEC13_RAT]	2,29861096
<b>Q07116</b>	Sulfite oxidase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Suox PE=1 SV=2 - [SUOX_RAT]	2,28871232
<b>P18292</b>	Prothrombin OS=Rattus norvegicus GN=F2 PE=1 SV=1 - [THRB_RAT]	2,28714601
<b>Q9WU49</b>	Calcium-regulated heat stable protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Carhsp1 PE=1 SV=1 - [CHSP1_RAT]	2,2850649
<b>Q5U3Z3</b>	Isochorismatase domain-containing protein 2, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Isoc2 PE=2 SV=1 - [ISOC2_RAT]	2,27342944
<b>B0BNM1</b>	NAD(P)H-hydrate epimerase OS=Rattus norvegicus GN=Apoa1bp PE=2 SV=1 - [NNRE_RAT]	2,26781153
<b>P70615</b>	Lamin-B1 OS=Rattus norvegicus GN=Lmnb1 PE=1 SV=3 - [LMNB1_RAT]	2,26712329
<b>P24329</b>	Thiosulfate sulfurtransferase OS=Rattus norvegicus GN=Tst PE=1 SV=3 - [THTR_RAT]	2,26711438
<b>P07335</b>	Creatine kinase B-type OS=Rattus norvegicus GN=Ckb PE=1 SV=2 - [KCRB_RAT]	2,26369441
<b>F1LM93</b>	Tyrosine-protein kinase Yes OS=Rattus norvegicus GN=Yes1 PE=1 SV=1 - [YES_RAT]	2,2629085
<b>Q5FVQ8</b>	NLR family member X1 OS=Rattus norvegicus GN=Nlr1 PE=2 SV=1 - [NLRX1_RAT]	2,25930901
<b>Q6AXS3</b>	Protein DEK OS=Rattus norvegicus GN=Dek PE=2 SV=1 - [DEK_RAT]	2,24629552
<b>P10824</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1 OS=Rattus norvegicus GN=Gnai1 PE=1 SV=3 - [GNAI1_RAT]	2,24371374
<b>Q5I0H9</b>	Protein disulfide-isomerase A5 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia5 PE=2 SV=1 - [PDIA5_RAT]	2,238614
<b>Q3B7U9</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8 OS=Rattus norvegicus GN=Fkbp8 PE=2 SV=1 - [FKBP8_RAT]	2,23672115

<b>Q05096</b>	Unconventional myosin-Ib OS=Rattus norvegicus GN=Myo1b PE=1 SV=1 - [MYO1B_RAT]	2,232888
<b>B2GV06</b>	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Oxct1 PE=1 SV=1 - [SCOT1_RAT]	2,23287092
<b>P47853</b>	Biglycan OS=Rattus norvegicus GN=Bgn PE=2 SV=1 - [PGS1_RAT]	2,22998984
<b>P15791</b>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta OS=Rattus norvegicus GN=Camk2d PE=1 SV=1 - [KCC2D_RAT]	2,2251225
<b>Q9JJ31</b>	Cullin-5 OS=Rattus norvegicus GN=Cul5 PE=1 SV=3 - [CUL5_RAT]	2,20928036
<b>P20650</b>	Protein phosphatase 1A OS=Rattus norvegicus GN=Ppm1a PE=1 SV=1 - [PPM1A_RAT]	2,20414936
<b>P13676</b>	Acylamino-acid-releasing enzyme OS=Rattus norvegicus GN=Apeh PE=1 SV=1 - [ACPH_RAT]	2,20401562
<b>Q923K9</b>	APOBEC1 complementation factor OS=Rattus norvegicus GN=A1cf PE=1 SV=1 - [A1CF_RAT]	2,20190612
<b>P63029</b>	Translationally-controlled tumor protein OS=Rattus norvegicus GN=Tpt1 PE=1 SV=1 - [TCTP_RAT]	2,20056091
<b>Q9WUH4</b>	Four and a half LIM domains protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Fhl1 PE=2 SV=1 - [FHL1_RAT]	2,19457447
<b>Q99PF5</b>	Far upstream element-binding protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Khsrp PE=1 SV=1 - [FUBP2_RAT]	2,19002404
<b>Q75WE7</b>	von Willebrand factor A domain-containing protein 5A OS=Rattus norvegicus GN=Vwa5a PE=2 SV=1 - [VWA5A_RAT]	2,18142243
<b>P80386</b>	5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-1 OS=Rattus norvegicus GN=Prkab1 PE=1 SV=4 - [AAKB1_RAT]	2,17431252
<b>Q641X8</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E OS=Rattus norvegicus GN=Eif3e PE=2 SV=1 - [EIF3E_RAT]	2,17401795
<b>Q6UPR8</b>	Endoplasmic reticulum metalloproteinase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Ermp1 PE=1 SV=1 - [ERMP1_RAT]	2,15971653
<b>Q3KRE0</b>	ATPase family AAA domain-containing protein 3 OS=Rattus norvegicus GN=Atad3 PE=1 SV=1 - [ATAD3_RAT]	2,1521664
<b>Q5XI32</b>	F-actin-capping protein subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Capzb PE=1 SV=1 - [CAPZB_RAT]	2,143134
<b>O35550</b>	Rab GTPase-binding effector protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Rabep1 PE=1 SV=1 - [RABE1_RAT]	2,13804662
<b>Q5RJR2</b>	Twinfilin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Twf1 PE=2 SV=1 - [TWF1_RAT]	2,12602686
<b>B5DFN2</b>	Adenosylhomocysteinase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Ahcy11 PE=1 SV=2 - [SAHH2_RAT]	2,12507594
<b>Q5FWY5</b>	AH receptor-interacting protein OS=Rattus norvegicus GN=Aip PE=1 SV=1 - [AIP_RAT]	2,12315389
<b>Q6AY09</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnp2 PE=1 SV=1 - [HNRH2_RAT]	2,10736381

<b>B0BNA7</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Rattus norvegicus GN=Eif3i PE=2 SV=1 - [EIF3I_RAT]	2,10404062
<b>O88202</b>	60 kDa lysophospholipase OS=Rattus norvegicus GN=Aspg PE=1 SV=1 - [LPP60_RAT]	2,10169304
<b>Q7TP52</b>	Carboxymethylenebutenolidase homolog OS=Rattus norvegicus GN=Cmbl PE=2 SV=1 - [CMBL_RAT]	2,09287202
<b>Q6TUG0</b>	DnaJ homolog subfamily B member 11 OS=Rattus norvegicus GN=Dnajb11 PE=2 SV=1 - [DJB11_RAT]	2,09187526
<b>P83006</b>	Platelet-activating factor acetylhydrolase 2, cytoplasmic OS=Rattus norvegicus GN=Pafah2 PE=1 SV=2 - [PAFA2_RAT]	2,08977965
<b>P20817</b>	Cytochrome P450 4A14 OS=Rattus norvegicus GN=Cyp4a14 PE=1 SV=2 - [CP4AE_RAT]	2,08922524
<b>P21708</b>	Mitogen-activated protein kinase 3 OS=Rattus norvegicus GN=Mapk3 PE=1 SV=5 - [MK03_RAT]	2,07805343
<b>Q63692</b>	Hsp90 co-chaperone Cdc37 OS=Rattus norvegicus GN=Cdc37 PE=1 SV=2 - [CDC37_RAT]	2,07384006
<b>P41542</b>	General vesicular transport factor p115 OS=Rattus norvegicus GN=Uso1 PE=1 SV=1 - [USO1_RAT]	2,06991179
<b>P62775</b>	Myotrophin OS=Rattus norvegicus GN=Mtpn PE=1 SV=2 - [MTPN_RAT]	2,06980658
<b>P27791</b>	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha OS=Rattus norvegicus GN=Prkaca PE=1 SV=2 - [KAPCA_RAT]	2,06573995
<b>P11030</b>	Acyl-CoA-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=Dbi PE=1 SV=3 - [ACBP_RAT]	2,06503512
<b>P17764</b>	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acat1 PE=1 SV=1 - [THIL_RAT]	2,06412693
<b>Q68FY0</b>	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Uqcrc1 PE=1 SV=1 - [QCR1_RAT]	2,06229569
<b>A2VD12</b>	Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pbxip1 PE=2 SV=1 - [PBIP1_RAT]	2,06221535
<b>Q6IRE4</b>	Tumor susceptibility gene 101 protein OS=Rattus norvegicus GN=Tsg101 PE=1 SV=1 - [TS101_RAT]	2,0569269
<b>P29410</b>	Adenylate kinase 2, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ak2 PE=2 SV=2 - [KAD2_RAT]	2,03325964
<b>P97697</b>	Inositol monophosphatase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Impa1 PE=1 SV=2 - [IMPA1_RAT]	2,02508761
<b>B5DFN3</b>	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 2 OS=Rattus norvegicus GN=Uqcc2 PE=2 SV=1 - [UQCC2_RAT]	2,00859692
<b>Q6AYG5</b>	Ethylmalonyl-CoA decarboxylase OS=Rattus norvegicus GN=Echdc1 PE=1 SV=1 - [ECHD1_RAT]	2,00768806
<b>Q641Y8</b>	ATP-dependent RNA helicase DDX1 OS=Rattus norvegicus GN=Ddx1 PE=2 SV=1 - [DDX1_RAT]	2,00538338

**Πίνακας Παραρτήματος 6:** Διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση στα SHR ζώα 6 εβδομάδων όπως προέκυψε από την ανάλυση του νεφρικού παρεγχύματος με LC-MS/MS. Το στατιστικό τεστ Mann-Whitney χρησιμοποιήθηκε. Όλες οι τιμές είναι στατιστικά σημαντικές με  $p < 0.05$

Κωδικός	Πρωτεΐνη	Λόγος Έκφρασης (SHR/WKY)
<b>O70511</b>	Ankyrin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Ank3 PE=1 SV=3 - [ANK3_RAT]	0,49918288
<b>P62902</b>	60S ribosomal protein L31 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl31 PE=2 SV=1 - [RL31_RAT]	0,49771928
<b>Q8CG45</b>	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2 OS=Rattus norvegicus GN=Akr7a2 PE=1 SV=2 - [ARK72_RAT]	0,49637662
<b>Q9WU82</b>	Catenin beta-1 OS=Rattus norvegicus GN=Ctnnb1 PE=1 SV=1 - [CTNB1_RAT]	0,4920788
<b>P97829</b>	Leukocyte surface antigen CD47 OS=Rattus norvegicus GN=Cd47 PE=1 SV=1 - [CD47_RAT]	0,4881796
<b>Q8R5M5</b>	2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase OS=Rattus norvegicus GN=Acmsd PE=1 SV=1 - [ACMSD_RAT]	0,48786584
<b>Q66HR2</b>	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 OS=Rattus norvegicus GN=Mapre1 PE=1 SV=3 - [MARE1_RAT]	0,48778068
<b>P07871</b>	3-ketoacyl-CoA thiolase B, peroxisomal OS=Rattus norvegicus GN=Acaa1b PE=1 SV=2 - [THIKB_RAT]	0,48649507
<b>P04904</b>	Glutathione S-transferase alpha-3 OS=Rattus norvegicus GN=Gsta3 PE=1 SV=3 - [GSTA3_RAT]	0,48223102
<b>O35795</b>	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Entpd2 PE=1 SV=1 - [ENTP2_RAT]	0,48108663
<b>Q52KK3</b>	Solute carrier family 25 member 51 OS=Rattus norvegicus GN=Slc25a51 PE=2 SV=1 - [S2551_RAT]	0,48053084
<b>Q6XQN1</b>	Nicotinate phosphoribosyltransferase OS=Rattus norvegicus GN=Naprt PE=2 SV=1 - [PNCB_RAT]	0,47660097
<b>P62332</b>	ADP-ribosylation factor 6 OS=Rattus norvegicus GN=Arf6 PE=1 SV=2 - [ARF6_RAT]	0,47192339
<b>P63324</b>	40S ribosomal protein S12 OS=Rattus norvegicus GN=Rps12 PE=1 SV=2 - [RS12_RAT]	0,46909816
<b>P85970</b>	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS=Rattus norvegicus GN=Arpc2 PE=1 SV=1 - [ARPC2_RAT]	0,46837114
<b>Q6AXR4</b>	Beta-hexosaminidase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Hexb PE=2 SV=1 - [HEXB_RAT]	0,4667994
<b>Q9WVK7</b>	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hadh PE=2 SV=1 - [HCDH_RAT]	0,46595889
<b>O35763</b>	Moesin OS=Rattus norvegicus GN=Msn PE=1 SV=3 - [MOES_RAT]	0,46537366

<b>Q6AY30</b>	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase OS=Rattus norvegicus GN=Sccpdh PE=2 SV=1 - [SCPDL_RAT]	0,46370816
<b>Q924C3</b>	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1 OS=Rattus norvegicus GN=Enpp1 PE=1 SV=2 - [ENPP1_RAT]	0,4624253
<b>P11517</b>	Hemoglobin subunit beta-2 OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2 - [HBB2_RAT]	0,46221032
<b>O88761</b>	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 OS=Rattus norvegicus GN=Psm1 PE=2 SV=1 - [PSMD1_RAT]	0,46116934
<b>P55260</b>	Annexin A4 OS=Rattus norvegicus GN=Anxa4 PE=1 SV=3 - [ANXA4_RAT]	0,4607634
<b>P62804</b>	Histone H4 OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h4b PE=1 SV=2 - [H4_RAT]	0,45910159
<b>Q5HZY2</b>	GTP-binding protein SAR1b OS=Rattus norvegicus GN=Sar1b PE=2 SV=1 - [SAR1B_RAT]	0,45814898
<b>Q80ZG1</b>	Synembryon-A OS=Rattus norvegicus GN=Ric8a PE=1 SV=2 - [RIC8A_RAT]	0,45794516
<b>Q9JHW0</b>	Proteasome subunit beta type-7 OS=Rattus norvegicus GN=Psm7 PE=1 SV=1 - [PSB7_RAT]	0,45549581
<b>Q63108</b>	Carboxylesterase 1E OS=Rattus norvegicus GN=Ces1e PE=2 SV=1 - [EST1E_RAT]	0,45523359
<b>P36876</b>	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform OS=Rattus norvegicus GN=Ppp2r2a PE=2 SV=1 - [2ABA_RAT]	0,45322043
<b>Q64536</b>	[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 2, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Pdk2 PE=1 SV=1 - [PDK2_RAT]	0,45273788
<b>D2XV59</b>	GTP-binding protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gtpbp1 PE=1 SV=1 - [GTPB1_RAT]	0,45239051
<b>P38918</b>	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3 OS=Rattus norvegicus GN=Akr7a3 PE=1 SV=2 - [ARK73_RAT]	0,45174722
<b>P82471</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha OS=Rattus norvegicus GN=Gnaq PE=2 SV=2 - [GNAQ_RAT]	0,45025383
<b>Q5XIG6</b>	N-acetylgalactosamine kinase OS=Rattus norvegicus GN=Galk2 PE=2 SV=1 - [GALK2_RAT]	0,44978275
<b>Q62753</b>	Syntaxin-binding protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Stxbp2 PE=2 SV=1 - [STXB2_RAT]	0,44920137
<b>Q6PDU7</b>	ATP synthase subunit g, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5l PE=1 SV=2 - [ATP5L_RAT]	0,44890553
<b>P48508</b>	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit OS=Rattus norvegicus GN=Gclm PE=1 SV=1 - [GSH0_RAT]	0,44655791
<b>D3ZKU7</b>	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 1 OS=Rattus norvegicus GN=Blc1s1 PE=3 SV=1 - [BL1S1_RAT]	0,44313086
<b>Q9JHL4</b>	Drebrin-like protein OS=Rattus norvegicus GN=Dbrn1 PE=1 SV=1 - [DBNL_RAT]	0,44298323
<b>P16391</b>	RT1 class I histocompatibility antigen, AA alpha chain OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2 - [HA12_RAT]	0,43590505
<b>Q6AYB4</b>	Heat shock 70 kDa protein 14 OS=Rattus norvegicus GN=Hspa14 PE=2 SV=1 - [HSP7E_RAT]	0,43498452

<b>F1LYQ8</b>	FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Farp1 PE=1 SV=2 - [FARP1_RAT]	0,43297859
<b>P61983</b>	14-3-3 protein gamma OS=Rattus norvegicus GN=Ywhag PE=1 SV=2 - [1433G_RAT]	0,42931123
<b>Q66HG3</b>	Beta-Ala-His dipeptidase OS=Rattus norvegicus GN=Cndp1 PE=1 SV=1 - [CNDP1_RAT]	0,42610484
<b>P40615</b>	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 OS=Rattus norvegicus GN=Dkc1 PE=1 SV=4 - [DKC1_RAT]	0,42594288
<b>P61206</b>	ADP-ribosylation factor 3 OS=Rattus norvegicus GN=Arf3 PE=2 SV=2 - [ARF3_RAT]	0,42526389
<b>Q9Z2M4</b>	Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase OS=Rattus norvegicus GN=Decr2 PE=2 SV=1 - [DECR2_RAT]	0,42309352
<b>O55012</b>	Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein OS=Rattus norvegicus GN=Picalm PE=1 SV=1 - [PICAL_RAT]	0,42275373
<b>P61751</b>	ADP-ribosylation factor 4 OS=Rattus norvegicus GN=Arf4 PE=2 SV=2 - [ARF4_RAT]	0,422429
<b>Q4G064</b>	2-methoxy-6-polyprenyl-1,4-benzoquinol methylase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Coq5 PE=2 SV=1 - [COQ5_RAT]	0,42088789
<b>P40112</b>	Proteasome subunit beta type-3 OS=Rattus norvegicus GN=Psm3 PE=1 SV=1 - [PSB3_RAT]	0,42027484
<b>P68101</b>	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 OS=Rattus norvegicus GN=Eif2s1 PE=1 SV=2 - [IF2A_RAT]	0,41955891
<b>O35821</b>	Myb-binding protein 1A OS=Rattus norvegicus GN=Mybbp1a PE=2 SV=2 - [MBB1A_RAT]	0,41932235
<b>Q5U1Y1</b>	Ras-related protein Rab-34 OS=Rattus norvegicus GN=Rab34 PE=2 SV=1 - [RAB34_RAT]	0,41308702
<b>P0CC09</b>	Histone H2A type 2-A OS=Rattus norvegicus GN=Hist2h2aa3 PE=1 SV=1 - [H2A2A_RAT]	0,40745792
<b>Q9Z0V6</b>	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Prdx3 PE=1 SV=2 - [PRDX3_RAT]	0,40728563
<b>Q5EB62</b>	Solute carrier family 25 member 46 OS=Rattus norvegicus GN=Slc25a46 PE=2 SV=2 - [S2546_RAT]	0,40712195
<b>O88797</b>	Disabled homolog 2 OS=Rattus norvegicus GN=Dab2 PE=1 SV=1 - [DAB2_RAT]	0,40427488
<b>Q08877</b>	Dynamamin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Dnm3 PE=1 SV=2 - [DYN3_RAT]	0,40408445
<b>P05708</b>	Hexokinase-1 OS=Rattus norvegicus GN=Hk1 PE=1 SV=4 - [HXK1_RAT]	0,40330448
<b>Q01984</b>	Histamine N-methyltransferase OS=Rattus norvegicus GN=Hnmt PE=1 SV=3 - [HNMT_RAT]	0,40057212
<b>P18886</b>	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cpt2 PE=1 SV=1 - [CPT2_RAT]	0,40021615
<b>P46720</b>	Solute carrier organic anion transporter family member 1A1 OS=Rattus norvegicus GN=Slco1a1 PE=1 SV=1 - [SO1A1_RAT]	0,39356684
<b>Q8VHF5</b>	Citrate synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cs PE=1 SV=1 - [CISY_RAT]	0,39015676

<b>Q6MG60</b>	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Ddah2 PE=1 SV=1 - [DDAH2_RAT]	0,38729256
<b>Q9EQT5</b>	Tubulointerstitial nephritis antigen-like OS=Rattus norvegicus GN=Tinagl1 PE=2 SV=1 - [TINAL_RAT]	0,38005248
<b>P10868</b>	Guanidinoacetate N-methyltransferase OS=Rattus norvegicus GN=Gamt PE=1 SV=2 - [GAMT_RAT]	0,37719826
<b>Q9Z1X1</b>	Extended synaptotagmin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Esyt1 PE=2 SV=1 - [ESYT1_RAT]	0,37688615
<b>P19356</b>	Porphobilinogen deaminase OS=Rattus norvegicus GN=Hmbs PE=1 SV=2 - [HEM3_RAT]	0,37274643
<b>Q64550</b>	UDP-glucuronosyltransferase 1-1 OS=Rattus norvegicus GN=Ugt1a1 PE=1 SV=1 - [UD11_RAT]	0,37164536
<b>O35078</b>	D-amino-acid oxidase OS=Rattus norvegicus GN=Dao PE=2 SV=1 - [OXDA_RAT]	0,36656624
<b>Q6P7Q4</b>	Lactoylglutathione lyase OS=Rattus norvegicus GN=Glo1 PE=1 SV=3 - [LGUL_RAT]	0,36256142
<b>Q2V057</b>	Probable proline dehydrogenase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Prodh2 PE=2 SV=1 - [PROD2_RAT]	0,35593144
<b>P23562</b>	Band 3 anion transport protein OS=Rattus norvegicus GN=Slc4a1 PE=2 SV=3 - [B3AT_RAT]	0,35517126
<b>P37199</b>	Nuclear pore complex protein Nup155 OS=Rattus norvegicus GN=Nup155 PE=1 SV=1 - [NU155_RAT]	0,3548696
<b>Q66HG6</b>	Carbonic anhydrase 5B, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ca5b PE=2 SV=1 - [CAH5B_RAT]	0,34936889
<b>Q8VHE9</b>	All-trans-retinol 13,14-reductase OS=Rattus norvegicus GN=Retsat PE=2 SV=1 - [RETST_RAT]	0,34909739
<b>P55314</b>	Complement component C8 beta chain OS=Rattus norvegicus GN=C8b PE=2 SV=2 - [CO8B_RAT]	0,34694896
<b>Q9WTW7</b>	Solute carrier family 23 member 1 OS=Rattus norvegicus GN=Slc23a1 PE=2 SV=1 - [S23A1_RAT]	0,34452764
<b>P62076</b>	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13 OS=Rattus norvegicus GN=Timm13 PE=3 SV=1 - [TIM13_RAT]	0,34217179
<b>Q641X3</b>	Beta-hexosaminidase subunit alpha OS=Rattus norvegicus GN=Hexa PE=2 SV=1 - [HEXA_RAT]	0,34052715
<b>Q925Q9</b>	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Sh3kbp1 PE=1 SV=2 - [SH3K1_RAT]	0,33869446
<b>Q562C6</b>	Leucine zipper transcription factor-like protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Lztlf1 PE=2 SV=1 - [LZTL1_RAT]	0,33733601
<b>Q66H59</b>	N-acetylneuraminate lyase OS=Rattus norvegicus GN=Npl PE=2 SV=1 - [NPL_RAT]	0,33139228
<b>P05964</b>	Protein S100-A6 OS=Rattus norvegicus GN=S100a6 PE=1 SV=3 - [S10A6_RAT]	0,3281246
<b>Q62871</b>	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2 OS=Rattus norvegicus GN=Dync1i2 PE=1 SV=1 - [DC1I2_RAT]	0,32186626
<b>Q6P4Z9</b>	COP9 signalosome complex subunit 8 OS=Rattus norvegicus GN=Cops8 PE=2 SV=1 - [CSN8_RAT]	0,31940095
<b>Q9ERR2</b>	COMM domain-containing protein 5 OS=Rattus norvegicus GN=Commd5 PE=2 SV=1 - [COMD5_RAT]	0,31695721

<b>P02696</b>	Retinol-binding protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Rbp1 PE=1 SV=2 - [RET1_RAT]	0,31675542
<b>Q63531</b>	Ribosomal protein S6 kinase alpha-1 OS=Rattus norvegicus GN=Rps6ka1 PE=1 SV=1 - [KS6A1_RAT]	0,3143336
<b>Q5PQT3</b>	Glycine N-acyltransferase OS=Rattus norvegicus GN=Glyat PE=2 SV=1 - [GLYAT_RAT]	0,31065245
<b>D4ABY2</b>	Coatomer subunit gamma-2 OS=Rattus norvegicus GN=Copg2 PE=3 SV=2 - [COPG2_RAT]	0,30824277
<b>P85845</b>	Fascin OS=Rattus norvegicus GN=Fscn1 PE=1 SV=2 - [FSCN1_RAT]	0,30719873
<b>Q4FZV0</b>	Beta-mannosidase OS=Rattus norvegicus GN=Manba PE=2 SV=1 - [MANBA_RAT]	0,29921005
<b>Q8CHM7</b>	2-hydroxyacyl-CoA lyase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Hacl1 PE=1 SV=1 - [HACL1_RAT]	0,2962861
<b>Q4KLL0</b>	Transcription elongation factor A protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Tcea1 PE=2 SV=1 - [TCEA1_RAT]	0,29546117
<b>P00502</b>	Glutathione S-transferase alpha-1 OS=Rattus norvegicus GN=Gsta1 PE=1 SV=3 - [GSTA1_RAT]	0,29507273
<b>P16036</b>	Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Slc25a3 PE=1 SV=1 - [MPCP_RAT]	0,29365085
<b>P62828</b>	GTP-binding nuclear protein Ran OS=Rattus norvegicus GN=Ran PE=1 SV=3 - [RAN_RAT]	0,27566023
<b>P11915</b>	Non-specific lipid-transfer protein OS=Rattus norvegicus GN=Scp2 PE=1 SV=3 - [NLTP_RAT]	0,27435895
<b>Q64640</b>	Adenosine kinase OS=Rattus norvegicus GN=Adk PE=1 SV=3 - [ADK_RAT]	0,27165123
<b>P84083</b>	ADP-ribosylation factor 5 OS=Rattus norvegicus GN=Arf5 PE=1 SV=2 - [ARF5_RAT]	0,27043495
<b>P06757</b>	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Adh1 PE=1 SV=3 - [ADH1_RAT]	0,27001046
<b>Q6P7B0</b>	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Rattus norvegicus GN=Wars PE=1 SV=2 - [SYWC_RAT]	0,26898066
<b>Q68FW9</b>	COP9 signalosome complex subunit 3 OS=Rattus norvegicus GN=Cops3 PE=2 SV=1 - [CSN3_RAT]	0,26833854
<b>P29314</b>	40S ribosomal protein S9 OS=Rattus norvegicus GN=Rps9 PE=1 SV=4 - [RS9_RAT]	0,26740891
<b>Q6P0K8</b>	Junction plakoglobin OS=Rattus norvegicus GN=Jup PE=1 SV=1 - [PLAK_RAT]	0,2638914
<b>Q9ERZ8</b>	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 OS=Rattus norvegicus GN=Trpv4 PE=1 SV=1 - [TRPV4_RAT]	0,263091
<b>Q9QYU2</b>	Elongation factor Ts, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Tsfm PE=2 SV=1 - [EFTS_RAT]	0,2621508
<b>G3V9R8</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpc PE=1 SV=2 - [HNRPC_RAT]	0,25859346
<b>P80385</b>	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-1 OS=Rattus norvegicus GN=Prkag1 PE=1 SV=3 - [AAKG1_RAT]	0,25748717
<b>Q9JHB5</b>	Translin-associated protein X OS=Rattus norvegicus GN=Tsnax PE=1 SV=1 - [TSNAX_RAT]	0,25502924



<b>P62749</b>	Hippocalcin-like protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Hpcal1 PE=1 SV=2 - [HPCL1_RAT]	0,24914782
<b>P62271</b>	40S ribosomal protein S18 OS=Rattus norvegicus GN=Rps18 PE=1 SV=3 - [RS18_RAT]	0,24633851
<b>O88994</b>	Mitochondrial amidoxime reducing component 2 OS=Rattus norvegicus GN=Marc2 PE=2 SV=1 - [MARC2_RAT]	0,24520604
<b>P17136</b>	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Snrpb PE=2 SV=1 - [RSMB_RAT]	0,24239055
<b>Q9ERE4</b>	Golgi phosphoprotein 3 OS=Rattus norvegicus GN=Golph3 PE=1 SV=1 - [GOLP3_RAT]	0,23373606
<b>B0BN18</b>	Prefoldin subunit 2 OS=Rattus norvegicus GN=Pfdn2 PE=2 SV=1 - [PFD2_RAT]	0,22917402
<b>P20673</b>	Argininosuccinate lyase OS=Rattus norvegicus GN=Asl PE=2 SV=1 - [ARLY_RAT]	0,22706342
<b>Q5RKI7</b>	Solute carrier family 7 member 13 OS=Rattus norvegicus GN=Slc7a13 PE=2 SV=1 - [S7A13_RAT]	0,22691187
<b>P23764</b>	Glutathione peroxidase 3 OS=Rattus norvegicus GN=Gpx3 PE=2 SV=2 - [GPX3_RAT]	0,21629492
<b>Q921A4</b>	Cytoglobin OS=Rattus norvegicus GN=Cygb PE=1 SV=1 - [CYGB_RAT]	0,21347697
<b>Q62639</b>	GTP-binding protein Rheb OS=Rattus norvegicus GN=Rheb PE=1 SV=1 - [RHEB_RAT]	0,2128887
<b>Q5BKD0</b>	Inactive 2'-5'-oligoadenylate synthase 1B OS=Rattus norvegicus GN=Oas1b PE=2 SV=1 - [OAS1B_RAT]	0,21248744
<b>Q6P7P5</b>	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bzw1 PE=2 SV=1 - [BZW1_RAT]	0,21017104
<b>P36511</b>	UDP-glucuronosyltransferase 2B15 OS=Rattus norvegicus GN=Ugt2b15 PE=1 SV=1 - [UDB15_RAT]	0,21006571
<b>P13264</b>	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Gls PE=1 SV=2 - [GLSK_RAT]	0,2047297
<b>P61805</b>	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit DAD1 OS=Rattus norvegicus GN=Dad1 PE=3 SV=3 - [DAD1_RAT]	0,20286165
<b>P12007</b>	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ivd PE=1 SV=2 - [IVD_RAT]	0,20219232
<b>Q9EQ76</b>	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 3 OS=Rattus norvegicus GN=Fmo3 PE=1 SV=1 - [FMO3_RAT]	0,19322461
<b>P11662</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2 OS=Rattus norvegicus GN=Mtnd2 PE=3 SV=3 - [NU2M_RAT]	0,18946756
<b>Q80X08</b>	WASH complex subunit FAM21 OS=Rattus norvegicus GN=Fam21 PE=2 SV=1 - [FAM21_RAT]	0,18307562
<b>Q63507</b>	60S ribosomal protein L14 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl14 PE=1 SV=3 - [RL14_RAT]	0,17969784
<b>P27139</b>	Carbonic anhydrase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Ca2 PE=1 SV=2 - [CAH2_RAT]	0,17878784
<b>P27952</b>	40S ribosomal protein S2 OS=Rattus norvegicus GN=Rps2 PE=1 SV=1 - [RS2_RAT]	0,17756523
<b>Q8K4B7</b>	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 4 OS=Rattus norvegicus GN=Fmo4 PE=2 SV=3 -	0,16854608

	[FMO4_RAT]	
<b>P31211</b>	Corticosteroid-binding globulin OS=Rattus norvegicus GN=Serpina6 PE=1 SV=2 - [CBG_RAT]	0,16525029
<b>P19511</b>	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5f1 PE=1 SV=1 - [AT5F1_RAT]	0,16013504
<b>Q5XID1</b>	Anamorsin OS=Rattus norvegicus GN=Ciapi1 PE=2 SV=1 - [CPIN1_RAT]	0,15957519
<b>P63174</b>	60S ribosomal protein L38 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl38 PE=1 SV=2 - [RL38_RAT]	0,15853746
<b>P62278</b>	40S ribosomal protein S13 OS=Rattus norvegicus GN=Rps13 PE=1 SV=2 - [RS13_RAT]	0,1522787
<b>Q6MGB5</b>	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8 OS=Rattus norvegicus GN=Hsd17b8 PE=3 SV=1 - [DHB8_RAT]	0,15049084
<b>Q9EPB1</b>	Dipeptidyl peptidase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Dpp7 PE=1 SV=1 - [DPP2_RAT]	0,1354537
<b>Q63433</b>	Serine/threonine-protein kinase N1 OS=Rattus norvegicus GN=Pkn1 PE=1 SV=2 - [PKN1_RAT]	0,13446763
<b>Q64537</b>	Calpain small subunit 1 OS=Rattus norvegicus GN=Capns1 PE=1 SV=3 - [CPNS1_RAT]	0,13254994
<b>Q9WVA1</b>	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A OS=Rattus norvegicus GN=Timm8a PE=1 SV=1 - [TIM8A_RAT]	0,12701185
<b>P38718</b>	Mitochondrial pyruvate carrier 2 OS=Rattus norvegicus GN=Mpc2 PE=2 SV=1 - [MPC2_RAT]	0,12651586
<b>P43278</b>	Histone H1.0 OS=Rattus norvegicus GN=H1f0 PE=2 SV=2 - [H10_RAT]	0,1260626
<b>D4A3K5</b>	Histone H1.1 OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h1a PE=3 SV=1 - [H11_RAT]	0,12534804
<b>P04905</b>	Glutathione S-transferase Mu 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm1 PE=1 SV=2 - [GSTM1_RAT]	0,12485158
<b>P50878</b>	60S ribosomal protein L4 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl4 PE=1 SV=3 - [RL4_RAT]	0,11916857
<b>D3ZAF6</b>	ATP synthase subunit f, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5j2 PE=1 SV=1 - [ATPK_RAT]	0,10727117
<b>O35353</b>	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4 OS=Rattus norvegicus GN=Gnb4 PE=2 SV=4 - [GBB4_RAT]	0,10662189
<b>P03889</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 OS=Rattus norvegicus GN=Mtnd1 PE=1 SV=3 - [NU1M_RAT]	0,09632898
<b>P02761</b>	Major urinary protein OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=1 - [MUP_RAT]	0,09426143
<b>D3ZN43</b>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 6 OS=Rattus norvegicus GN=Ndufaf6 PE=3 SV=1 - [NDUF6_RAT]	0,0916909
<b>Q9EQV6</b>	Tripeptidyl-peptidase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Tpp1 PE=1 SV=1 - [TPP1_RAT]	0,08747747
<b>Q9Z142</b>	Transmembrane protein 33 OS=Rattus norvegicus GN=Tmem33 PE=2 SV=1 - [TMM33_RAT]	0,07270973
<b>Q6JE36</b>	Protein NDRG1 OS=Rattus norvegicus GN=Ndr1 PE=1 SV=1 - [NDRG1_RAT]	0,06869022

<b>P62425</b>	60S ribosomal protein L7a OS=Rattus norvegicus GN=Rpl7a PE=1 SV=2 - [RL7A_RAT]	0,05621827
<b>Q6PEC4</b>	S-phase kinase-associated protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Skp1 PE=2 SV=3 - [SKP1_RAT]	0,05579102
<b>P16232</b>	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1 OS=Rattus norvegicus GN=Hsd11b1 PE=1 SV=2 - [DHI1_RAT]	0,05543251
<b>Q5U2Z7</b>	Rho GTPase-activating protein 24 OS=Rattus norvegicus GN=Arhgap24 PE=2 SV=2 - [RHG24_RAT]	0,05224348
<b>Q923J6</b>	Dynein heavy chain 12, axonemal OS=Rattus norvegicus GN=Dnah12 PE=2 SV=2 - [DYH12_RAT]	0,04457197
<b>Q505J9</b>	ATPase family AAA domain-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Atad1 PE=1 SV=1 - [ATAD1_RAT]	0,01941326

**Πίνακας Παραρτήματος 7:** Διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στα SHR ζώα 13 εβδομάδων όπως προέκυψε από την ανάλυση του νεφρικού παρεγχύματος με LC-MS/MS. Το στατιστικό τεστ Mann-Whitney χρησιμοποιήθηκε. Όλες οι τιμές είναι στατιστικά σημαντικές με  $p < 0.05$

Κωδικός	Πρωτεΐνη	Λόγος Έκφρασης (SHR/WKY)
<b>Q5XI72</b>	Eukaryotic translation initiation factor 4H OS=Rattus norvegicus GN=Eif4h PE=1 SV=1 - [IF4H_RAT]	217,63
<b>Q6PEC1</b>	Tubulin-specific chaperone A OS=Rattus norvegicus GN=Tbca PE=1 SV=1 - [TBCA_RAT]	139,58
<b>P61354</b>	60S ribosomal protein L27 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl27 PE=2 SV=2 - [RL27_RAT]	32,36
<b>Q9Z0V5</b>	Peroxiredoxin-4 OS=Rattus norvegicus GN=Prdx4 PE=2 SV=1 - [PRDX4_RAT]	28,23
<b>P41498</b>	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase OS=Rattus norvegicus GN=Acp1 PE=1 SV=3 - [PPAC_RAT]	25,39
<b>Q6SKG1</b>	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM3, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acsm3 PE=2 SV=1 - [ACSM3_RAT]	23,55
<b>Q68FT5</b>	S-methylmethionine--homocysteine S-methyltransferase BHMT2 OS=Rattus norvegicus GN=Bhmt2 PE=2 SV=1 - [BHMT2_RAT]	17,43
<b>Q7TQ16</b>	Cytochrome b-c1 complex subunit 8 OS=Rattus norvegicus GN=Uqcrq PE=3 SV=1 - [QCR8_RAT]	15,69
<b>Q4G064</b>	2-methoxy-6-polyprenyl-1,4-benzoquinol methylase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Coq5 PE=2 SV=1 - [COQ5_RAT]	10,73
<b>P11232</b>	Thioredoxin OS=Rattus norvegicus GN=Txn PE=1 SV=2 - [THIO_RAT]	10,29
<b>P08289</b>	Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme OS=Rattus norvegicus GN=Alpl PE=1 SV=2 - [PPBT_RAT]	9,95
<b>P04692</b>	Tropomyosin alpha-1 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm1 PE=1 SV=3 - [TPM1_RAT]	9,64
<b>P97546</b>	Neuroplastin OS=Rattus norvegicus GN=Nptn PE=1 SV=2 - [NPTN_RAT]	9,45
<b>Q4QQW3</b>	Hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Adhfe1 PE=1 SV=1 - [HOT_RAT]	9,26
<b>Q5U2X7</b>	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim21 OS=Rattus norvegicus GN=Timm21 PE=2 SV=1 - [TIM21_RAT]	8,48
<b>B0BNF1</b>	Septin-8 OS=Rattus norvegicus GN=Sept8 PE=1 SV=1 - [SEPT8_RAT]	7,88
<b>O54861</b>	Sortilin OS=Rattus norvegicus GN=Sort1 PE=1 SV=3 - [SORT_RAT]	7,71

<b>Q6AYF4</b>	Integrin beta-6 OS=Rattus norvegicus GN=Itgb6 PE=2 SV=1 - [ITB6_RAT]	7,31
<b>Q8VI04</b>	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase OS=Rattus norvegicus GN=Asrgl1 PE=1 SV=1 - [ASGL1_RAT]	6,57
<b>Q6AYT9</b>	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM5, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acsm5 PE=2 SV=1 - [ACSM5_RAT]	6,45
<b>Q9EPJ3</b>	28S ribosomal protein S26, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Mrps26 PE=1 SV=1 - [RT26_RAT]	6,40
<b>D3ZTX0</b>	Transmembrane emp24 domain-containing protein 7 OS=Rattus norvegicus GN=Tmed7 PE=1 SV=1 - [TMED7_RAT]	6,35
<b>P21533</b>	60S ribosomal protein L6 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl6 PE=1 SV=5 - [RL6_RAT]	6,09
<b>P62997</b>	Transformer-2 protein homolog beta OS=Rattus norvegicus GN=Tra2b PE=1 SV=1 - [TRA2B_RAT]	5,94
<b>Q66H68</b>	RNA-binding protein 47 OS=Rattus norvegicus GN=Rbm47 PE=2 SV=1 - [RBM47_RAT]	5,83
<b>D3ZJP6</b>	Unconventional myosin-X OS=Rattus norvegicus GN=Myo10 PE=1 SV=1 - [MYO10_RAT]	5,79
<b>Q62975</b>	Protein Z-dependent protease inhibitor OS=Rattus norvegicus GN=Serpina10 PE=2 SV=2 - [ZPI_RAT]	5,61
<b>P07895</b>	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Sod2 PE=1 SV=2 - [SODM_RAT]	5,58
<b>A1A5S1</b>	Pre-mRNA-processing factor 6 OS=Rattus norvegicus GN=Prpf6 PE=2 SV=1 - [PRP6_RAT]	5,56
<b>Q7TP52</b>	Carboxymethylenebutenolide homolog OS=Rattus norvegicus GN=Cmb1 PE=2 SV=1 - [CMBL_RAT]	5,36
<b>Q6AYT3</b>	tRNA-splicing ligase RtcB homolog OS=Rattus norvegicus GN=RtcB PE=2 SV=1 - [RTCB_RAT]	5,34
<b>Q91ZQ0</b>	Vacuole membrane protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Vmp1 PE=1 SV=1 - [VMP1_RAT]	5,26
<b>Q63228</b>	Glia maturation factor beta OS=Rattus norvegicus GN=Gmfb PE=1 SV=2 - [GMFB_RAT]	5,18
<b>O70594</b>	Solute carrier family 22 member 5 OS=Rattus norvegicus GN=Slc22a5 PE=1 SV=1 - [S22A5_RAT]	5,16
<b>Q9JHY2</b>	Sideroflexin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Sfxn3 PE=2 SV=1 - [SFXN3_RAT]	5,08
<b>P05765</b>	40S ribosomal protein S21 OS=Rattus norvegicus GN=Rps21 PE=1 SV=1 - [RS21_RAT]	5,02
<b>Q62696</b>	Disks large homolog 1 OS=Rattus norvegicus GN=Dlg1 PE=1 SV=1 - [DLG1_RAT]	4,85
<b>P07632</b>	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Rattus norvegicus GN=Sod1 PE=1 SV=2 - [SODC_RAT]	4,82
<b>Q07116</b>	Sulfite oxidase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Suox PE=1 SV=2 - [SUOX_RAT]	4,82
<b>Q7TT47</b>	Paraplegin OS=Rattus norvegicus GN=Spg7 PE=2 SV=1 - [SPG7_RAT]	4,78
<b>Q5XJW2</b>	Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gadd45gip1 PE=2 SV=2 - [G45IP_RAT]	4,73

<b>P53042</b>	Serine/threonine-protein phosphatase 5 OS=Rattus norvegicus GN=Ppp5c PE=1 SV=1 - [PPP5_RAT]	4,70
<b>P10686</b>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-1 OS=Rattus norvegicus GN=Plcg1 PE=1 SV=1 - [PLCG1_RAT]	4,69
<b>P63004</b>	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha OS=Rattus norvegicus GN=Pafah1b1 PE=1 SV=2 - [LIS1_RAT]	4,61
<b>Q62839</b>	Golgin subfamily A member 2 OS=Rattus norvegicus GN=Golga2 PE=1 SV=3 - [GOGA2_RAT]	4,52
<b>P40615</b>	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 OS=Rattus norvegicus GN=Dkc1 PE=1 SV=4 - [DKC1_RAT]	4,52
<b>P50170</b>	Retinol dehydrogenase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Rdh2 PE=1 SV=1 - [RDH2_RAT]	4,48
<b>P47198</b>	60S ribosomal protein L22 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl22 PE=2 SV=2 - [RL22_RAT]	4,41
<b>P13086</b>	Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Suc1g1 PE=2 SV=2 - [SUCA_RAT]	4,40
<b>Q66H39</b>	ATP-binding cassette sub-family F member 3 OS=Rattus norvegicus GN=Abcf3 PE=2 SV=1 - [ABCF3_RAT]	4,37
<b>Q704E8</b>	ATP-binding cassette sub-family B member 7, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Abcb7 PE=1 SV=1 - [ABCB7_RAT]	4,35
<b>Q5U1Y4</b>	1,5-anhydro-D-fructose reductase OS=Rattus norvegicus GN=Akr1e2 PE=2 SV=1 - [AKCL2_RAT]	4,32
<b>P18420</b>	Proteasome subunit alpha type-1 OS=Rattus norvegicus GN=Psm1 PE=1 SV=2 - [PSA1_RAT]	4,18
<b>Q9WVK3</b>	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase OS=Rattus norvegicus GN=Pecr PE=2 SV=1 - [PECR_RAT]	4,10
<b>Q6AYN4</b>	Phytanoyl-CoA hydroxylase-interacting protein-like OS=Rattus norvegicus GN=Phyhipl PE=2 SV=2 - [PHIPL_RAT]	4,08
<b>D4A631</b>	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Arfgef1 PE=1 SV=1 - [BIG1_RAT]	4,07
<b>B0BNC9</b>	Quinone oxidoreductase-like protein 2 OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=1 - [QORL2_RAT]	4,00
<b>P24329</b>	Thiosulfate sulfurtransferase OS=Rattus norvegicus GN=Tst PE=1 SV=3 - [THTR_RAT]	3,95
<b>P04550</b>	Parathyrosin OS=Rattus norvegicus GN=Ptms PE=1 SV=2 - [PTMS_RAT]	3,94
<b>Q499U2</b>	Engulfment and cell motility protein 3 OS=Rattus norvegicus GN=Elmo3 PE=2 SV=1 - [ELMO3_RAT]	3,85
<b>P10111</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Rattus norvegicus GN=Ppia PE=1 SV=2 - [PIIA_RAT]	3,84
<b>Q6MGD0</b>	Protein CutA OS=Rattus norvegicus GN=Cuta PE=1 SV=2 - [CUTA_RAT]	3,64
<b>Q66HR2</b>	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 OS=Rattus norvegicus GN=Mapre1 PE=1 SV=3 -	3,58

	[MARE1_RAT]	
<b>Q3ZAV8</b>	Enhancer of mRNA-decapping protein 4 OS=Rattus norvegicus GN=Edc4 PE=2 SV=1 - [EDC4_RAT]	3,55
<b>Q91ZW6</b>	Trimethyllysine dioxygenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Tmlhe PE=1 SV=2 - [TMLH_RAT]	3,54
<b>Q5XI29</b>	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7 OS=Rattus norvegicus GN=Cpsf7 PE=2 SV=1 - [CPSF7_RAT]	3,51
<b>Q9Z2S9</b>	Flotillin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Flot2 PE=1 SV=1 - [FLOT2_RAT]	3,50
<b>Q9WUH4</b>	Four and a half LIM domains protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Fhl1 PE=2 SV=1 - [FHL1_RAT]	3,50
<b>P22509</b>	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar OS=Rattus norvegicus GN=Fbl PE=1 SV=2 - [FBRL_RAT]	3,49
<b>P12369</b>	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit OS=Rattus norvegicus GN=Prkar2b PE=1 SV=3 - [KAP3_RAT]	3,47
<b>P18614</b>	Integrin alpha-1 OS=Rattus norvegicus GN=Itga1 PE=1 SV=1 - [ITA1_RAT]	3,46
<b>Q5BJP9</b>	Phytanoyl-CoA dioxygenase domain-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Phyhd1 PE=2 SV=1 - [PHYD1_RAT]	3,45
<b>P23928</b>	Alpha-crystallin B chain OS=Rattus norvegicus GN=Cryab PE=1 SV=1 - [CRYAB_RAT]	3,44
<b>Q63707</b>	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Dhodh PE=1 SV=1 - [PYRD_RAT]	3,40
<b>P12001</b>	60S ribosomal protein L18 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl18 PE=2 SV=2 - [RL18_RAT]	3,38
<b>Q62645</b>	Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2D OS=Rattus norvegicus GN=Grin2d PE=1 SV=2 - [NMDE4_RAT]	3,37
<b>P10888</b>	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cox4i1 PE=1 SV=1 - [COX41_RAT]	3,36
<b>Q5XIK7</b>	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 1 OS=Rattus norvegicus GN=Katnal1 PE=2 SV=1 - [KATL1_RAT]	3,36
<b>P53565</b>	Homeobox protein cut-like 1 OS=Rattus norvegicus GN=Cux1 PE=1 SV=2 - [CUX1_RAT]	3,33
<b>P50297</b>	Arylamine N-acetyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Nat1 PE=2 SV=1 - [ARY1_RAT]	3,30
<b>P97700</b>	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein OS=Rattus norvegicus GN=Slc25a11 PE=2 SV=3 - [M2OM_RAT]	3,30
<b>Q76IC5</b>	Pyroglutamyl-peptidase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgpep1 PE=1 SV=1 - [PGPI_RAT]	3,25
<b>Q5XFW8</b>	Protein SEC13 homolog OS=Rattus norvegicus GN=Sec13 PE=1 SV=1 - [SEC13_RAT]	3,23
<b>P11167</b>	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 OS=Rattus norvegicus GN=Slc2a1 PE=1 SV=1 -	3,23

	[GTR1_RAT]	
<b>Q5PPN5</b>	Tubulin polymerization-promoting protein family member 3 OS=Rattus norvegicus GN=Tppp3 PE=2 SV=1 - [TPPP3_RAT]	3,22
<b>Q920L2</b>	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Sdha PE=1 SV=1 - [SDHA_RAT]	3,17
<b>O55159</b>	Epithelial cell adhesion molecule OS=Rattus norvegicus GN=Epcam PE=1 SV=1 - [EPCAM_RAT]	3,14
<b>P07379</b>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP] OS=Rattus norvegicus GN=Pck1 PE=1 SV=1 - [PCKGC_RAT]	3,09
<b>O89047</b>	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 3 OS=Rattus norvegicus GN=Kcnh3 PE=2 SV=1 - [KCNH3_RAT]	3,06
<b>Q9JIY6</b>	Probable N-acetyltransferase CML6 OS=Rattus norvegicus GN=Cml6 PE=2 SV=1 - [CMLO6_RAT]	3,05
<b>P28075</b>	Proteasome subunit beta type-5 OS=Rattus norvegicus GN=Psm5 PE=1 SV=3 - [PSB5_RAT]	3,03
<b>P20650</b>	Protein phosphatase 1A OS=Rattus norvegicus GN=Ppm1a PE=1 SV=1 - [PPM1A_RAT]	3,01
<b>P55159</b>	Serum paraoxonase/arylesterase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pon1 PE=1 SV=3 - [PON1_RAT]	3,01
<b>P09006</b>	Serine protease inhibitor A3N OS=Rattus norvegicus GN=Serpina3n PE=1 SV=3 - [SPA3N_RAT]	3,00
<b>P19643</b>	Amine oxidase [flavin-containing] B OS=Rattus norvegicus GN=Maob PE=1 SV=3 - [AOFB_RAT]	2,99
<b>P02770</b>	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	2,98
<b>Q62871</b>	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2 OS=Rattus norvegicus GN=Dync1i2 PE=1 SV=1 - [DC1I2_RAT]	2,95
<b>P53792</b>	Sodium/glucose cotransporter 2 OS=Rattus norvegicus GN=Slc5a2 PE=2 SV=1 - [SC5A2_RAT]	2,92
<b>Q9WTT6</b>	Guanine deaminase OS=Rattus norvegicus GN=Gda PE=1 SV=1 - [GUAD_RAT]	2,91
<b>P63326</b>	40S ribosomal protein S10 OS=Rattus norvegicus GN=Rps10 PE=2 SV=1 - [RS10_RAT]	2,88
<b>P01041</b>	Cystatin-B OS=Rattus norvegicus GN=Cstb PE=1 SV=1 - [CYTB_RAT]	2,85
<b>P12336</b>	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2 OS=Rattus norvegicus GN=Slc2a2 PE=2 SV=1 - [GTR2_RAT]	2,84
<b>P52847</b>	Sulfotransferase family cytosolic 1B member 1 OS=Rattus norvegicus GN=Sult1b1 PE=1 SV=2 - [ST1B1_RAT]	2,82
<b>B2GUZ5</b>	F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Rattus norvegicus GN=Capza1 PE=1 SV=1 - [CAZA1_RAT]	2,76
<b>Q05982</b>	Nucleoside diphosphate kinase A OS=Rattus norvegicus GN=Nme1 PE=1 SV=1 - [NDKA_RAT]	2,75
<b>A2VCW</b>	Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aass PE=2 SV=1 -	2,75



<b>9</b>	[AASS_RAT]	
<b>Q66HG5</b>	Transmembrane 9 superfamily member 2 OS=Rattus norvegicus GN=Tm9sf2 PE=2 SV=1 - [TM9S2_RAT]	2,75
<b>P14659</b>	Heat shock-related 70 kDa protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Hspa2 PE=1 SV=2 - [HSP72_RAT]	2,70
<b>Q562C9</b>	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase OS=Rattus norvegicus GN=Adi1 PE=2 SV=1 - [MTND_RAT]	2,69
<b>P47875</b>	Cysteine and glycine-rich protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Csrp1 PE=2 SV=2 - [CSR1_RAT]	2,68
<b>P13255</b>	Glycine N-methyltransferase OS=Rattus norvegicus GN=Gnmt PE=1 SV=2 - [GNMT_RAT]	2,67
<b>Q68FS4</b>	Cytosol aminopeptidase OS=Rattus norvegicus GN=Lap3 PE=1 SV=1 - [AMPL_RAT]	2,66
<b>Q6AYU3</b>	DnaJ homolog subfamily B member 6 OS=Rattus norvegicus GN=Dnajb6 PE=1 SV=1 - [DNJB6_RAT]	2,66
<b>P27139</b>	Carbonic anhydrase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Ca2 PE=1 SV=2 - [CAH2_RAT]	2,66
<b>Q63945</b>	Protein SET OS=Rattus norvegicus GN=Set PE=2 SV=2 - [SET_RAT]	2,62
<b>Q66HF8</b>	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh1b1 PE=1 SV=1 - [AL1B1_RAT]	2,62
<b>B3GNI6</b>	Septin-11 OS=Rattus norvegicus GN=Sept11 PE=1 SV=1 - [SEP11_RAT]	2,61
<b>P18421</b>	Proteasome subunit beta type-1 OS=Rattus norvegicus GN=Psmb1 PE=1 SV=3 - [PSB1_RAT]	2,61
<b>Q63610</b>	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm3 PE=1 SV=2 - [TPM3_RAT]	2,60
<b>P50137</b>	Transketolase OS=Rattus norvegicus GN=Tkt PE=1 SV=1 - [TKT_RAT]	2,57
<b>P10633</b>	Cytochrome P450 2D1 OS=Rattus norvegicus GN=Cyp2d1 PE=2 SV=1 - [CP2D1_RAT]	2,56
<b>B5DFN2</b>	Adenosylhomocysteinase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Ahcyl1 PE=1 SV=2 - [SAHH2_RAT]	2,55
<b>P22791</b>	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	2,53
<b>P00697</b>	Lysozyme C-1 OS=Rattus norvegicus GN=Lyz1 PE=1 SV=2 - [LYSC1_RAT]	2,53
<b>Q5XHZ0</b>	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Trap1 PE=1 SV=1 - [TRAP1_RAT]	2,53
<b>P20059</b>	Hemopexin OS=Rattus norvegicus GN=Hpx PE=1 SV=3 - [HEMO_RAT]	2,53
<b>O88506</b>	STE20/SPS1-related proline-alanine-rich protein kinase OS=Rattus norvegicus GN=Stk39 PE=2 SV=2 - [STK39_RAT]	2,51
<b>P24473</b>	Glutathione S-transferase kappa 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gstk1 PE=1 SV=3 - [GSTK1_RAT]	2,49
<b>Q7TQ94</b>	Nitrilase homolog 1 OS=Rattus norvegicus GN=Nit1 PE=2 SV=1 - [NIT1_RAT]	2,48

<b>P08010</b>	Glutathione S-transferase Mu 2 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm2 PE=1 SV=2 - [GSTM2_RAT]	2,46
<b>Q9JHU5</b>	Arfaptin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Arfp1 PE=2 SV=1 - [ARFP1_RAT]	2,44
<b>P42123</b>	L-lactate dehydrogenase B chain OS=Rattus norvegicus GN=Ldhb PE=1 SV=2 - [LDHB_RAT]	2,44
<b>Q5RJP0</b>	Aldose reductase-related protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Akr1b7 PE=1 SV=1 - [ALD1_RAT]	2,43
<b>Q9JMJ4</b>	Pre-mRNA-processing factor 19 OS=Rattus norvegicus GN=Prpf19 PE=1 SV=2 - [PRP19_RAT]	2,43
<b>P62898</b>	Cytochrome c, somatic OS=Rattus norvegicus GN=Cycc PE=1 SV=2 - [CYC_RAT]	2,40
<b>Q62739</b>	Rab-3A-interacting protein OS=Rattus norvegicus GN=Rab3ip PE=1 SV=1 - [RAB3I_RAT]	2,40
<b>Q6AYB4</b>	Heat shock 70 kDa protein 14 OS=Rattus norvegicus GN=Hspa14 PE=2 SV=1 - [HSP7E_RAT]	2,39
<b>Q64542</b>	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4 OS=Rattus norvegicus GN=Atp2b4 PE=2 SV=1 - [AT2B4_RAT]	2,39
<b>Q6AXY0</b>	Glutathione S-transferase A6 OS=Rattus norvegicus GN=Gsta6 PE=1 SV=1 - [GSTA6_RAT]	2,38
<b>Q0D2L3</b>	Agmatinase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Agmat PE=2 SV=1 - [SPEB_RAT]	2,38
<b>F1LP90</b>	Misshapen-like kinase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Mink1 PE=1 SV=2 - [MINK1_RAT]	2,37
<b>Q2TL32</b>	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4 OS=Rattus norvegicus GN=Ubr4 PE=1 SV=2 - [UBR4_RAT]	2,36
<b>Q704S8</b>	Carnitine O-acetyltransferase OS=Rattus norvegicus GN=Crat PE=1 SV=1 - [CACP_RAT]	2,35
<b>P54319</b>	Phospholipase A-2-activating protein OS=Rattus norvegicus GN=Plaa PE=2 SV=3 - [PLAP_RAT]	2,35
<b>Q9WV97</b>	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9 OS=Rattus norvegicus GN=Timm9 PE=1 SV=3 - [TIM9_RAT]	2,34
<b>Q9QYL8</b>	Acyl-protein thioesterase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Lypla2 PE=1 SV=1 - [LYPA2_RAT]	2,33
<b>Q8VID1</b>	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4 OS=Rattus norvegicus GN=Dhrs4 PE=2 SV=2 - [DHRS4_RAT]	2,33
<b>P10687</b>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1 OS=Rattus norvegicus GN=Plcb1 PE=1 SV=1 - [PLCB1_RAT]	2,33
<b>Q7TSE9</b>	HCLS1-associated protein X-1 OS=Rattus norvegicus GN=Hax1 PE=1 SV=1 - [HAX1_RAT]	2,32
<b>P50554</b>	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Abat PE=1 SV=3 - [GABT_RAT]	2,30
<b>P17220</b>	Proteasome subunit alpha type-2 OS=Rattus norvegicus GN=Psm2 PE=1 SV=3 - [PSA2_RAT]	2,30
<b>P86252</b>	Transcriptional activator protein Pur-alpha (Fragments) OS=Rattus norvegicus GN=Pura PE=1 SV=1 - [PURA_RAT]	2,29
<b>Q5BK32</b>	FAS-associated factor 2 OS=Rattus norvegicus GN=Faf2 PE=2 SV=1 - [FAF2_RAT]	2,29

<b>Q63413</b>	Spliceosome RNA helicase Ddx39b OS=Rattus norvegicus GN=Ddx39b PE=2 SV=3 - [DX39B_RAT]	2,29
<b>Q9R0J8</b>	Legumain OS=Rattus norvegicus GN=Lgmn PE=1 SV=1 - [LGMN_RAT]	2,28
<b>P32198</b>	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform OS=Rattus norvegicus GN=Cpt1a PE=1 SV=2 - [CPT1A_RAT]	2,28
<b>P30835</b>	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type OS=Rattus norvegicus GN=Pfk1 PE=2 SV=3 - [PFKAL_RAT]	2,28
<b>P13635</b>	Ceruloplasmin OS=Rattus norvegicus GN=Cp PE=1 SV=3 - [CERU_RAT]	2,27
<b>P37397</b>	Calponin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Cnn3 PE=1 SV=1 - [CNN3_RAT]	2,27
<b>Q9ESW0</b>	DNA damage-binding protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Ddb1 PE=2 SV=1 - [DDB1_RAT]	2,26
<b>Q66H59</b>	N-acetylneuraminate lyase OS=Rattus norvegicus GN=Npl PE=2 SV=1 - [NPL_RAT]	2,24
<b>P17764</b>	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acat1 PE=1 SV=1 - [THIL_RAT]	2,21
<b>P35427</b>	60S ribosomal protein L13a OS=Rattus norvegicus GN=Rpl13a PE=1 SV=2 - [RL13A_RAT]	2,21
<b>Q9R0W2</b>	Solute carrier family 22 member 2 OS=Rattus norvegicus GN=Slc22a2 PE=1 SV=1 - [S22A2_RAT]	2,19
<b>Q642A7</b>	Protein FAM151A OS=Rattus norvegicus GN=Fam151a PE=2 SV=1 - [F151A_RAT]	2,19
<b>P19112</b>	Fructose-1,6-bisphosphatase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Fbp1 PE=1 SV=2 - [F16P1_RAT]	2,17
<b>P02680</b>	Fibrinogen gamma chain OS=Rattus norvegicus GN=Fgg PE=1 SV=3 - [FIBG_RAT]	2,15
<b>Q63433</b>	Serine/threonine-protein kinase N1 OS=Rattus norvegicus GN=Pkn1 PE=1 SV=2 - [PKN1_RAT]	2,15
<b>Q5FVQ4</b>	Malectin OS=Rattus norvegicus GN=Mlec PE=2 SV=1 - [MLEC_RAT]	2,14
<b>P61107</b>	Ras-related protein Rab-14 OS=Rattus norvegicus GN=Rab14 PE=1 SV=3 - [RAB14_RAT]	2,14
<b>Q9JIX3</b>	Bis(5'-adenosyl)-triphosphatase OS=Rattus norvegicus GN=Fhit PE=1 SV=1 - [FHIT_RAT]	2,14
<b>Q8CGS5</b>	Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Elac2 PE=2 SV=1 - [RNZ2_RAT]	2,14
<b>P42676</b>	Neurolysin, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Nln PE=1 SV=1 - [NEUL_RAT]	2,13
<b>P14882</b>	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Pcca PE=1 SV=3 - [PCCA_RAT]	2,11
<b>P84245</b>	Histone H3.3 OS=Rattus norvegicus GN=H3f3b PE=1 SV=2 - [H33_RAT]	2,11
<b>Q9QXU2</b>	Surfeit locus protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Surf1 PE=2 SV=1 - [SURF1_RAT]	2,11
<b>P18422</b>	Proteasome subunit alpha type-3 OS=Rattus norvegicus GN=Psma3 PE=1 SV=3 - [PSA3_RAT]	2,11
<b>P42930</b>	Heat shock protein beta-1 OS=Rattus norvegicus GN=Hspb1 PE=1 SV=1 - [HSPB1_RAT]	2,09
<b>P18292</b>	Prothrombin OS=Rattus norvegicus GN=F2 PE=1 SV=1 - [THRB_RAT]	2,08

<b>P49242</b>	40S ribosomal protein S3a OS=Rattus norvegicus GN=Rps3a PE=1 SV=2 - [RS3A_RAT]	2,07
<b>Q8R478</b>	WW domain-binding protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Wbp2 PE=1 SV=1 - [WBP2_RAT]	2,07
<b>Q9Z339</b>	Glutathione S-transferase omega-1 OS=Rattus norvegicus GN=Gsto1 PE=1 SV=2 - [GSTO1_RAT]	2,06
<b>Q71UE8</b>	NEDD8 OS=Rattus norvegicus GN=Nedd8 PE=1 SV=1 - [NEDD8_RAT]	2,05
<b>O70196</b>	Prolyl endopeptidase OS=Rattus norvegicus GN=Prep PE=1 SV=1 - [PPCE_RAT]	2,03
<b>Q7TP98</b>	Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Rattus norvegicus GN=Ilf2 PE=2 SV=1 - [ILF2_RAT]	2,03
<b>Q4V8H8</b>	EH domain-containing protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Ehd2 PE=1 SV=1 - [EHD2_RAT]	2,03
<b>Q5XI73</b>	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Rattus norvegicus GN=Arhgdia PE=1 SV=1 - [GDIR1_RAT]	2,02
<b>P14740</b>	Dipeptidyl peptidase 4 OS=Rattus norvegicus GN=Dpp4 PE=1 SV=2 - [DPP4_RAT]	2,02
<b>P29410</b>	Adenylate kinase 2, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ak2 PE=2 SV=2 - [KAD2_RAT]	2,02
<b>P21531</b>	60S ribosomal protein L3 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl3 PE=1 SV=3 - [RL3_RAT]	2,02
<b>P15651</b>	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acads PE=1 SV=2 - [ACADS_RAT]	2,01
<b>P00762</b>	Anionic trypsin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Prss1 PE=1 SV=1 - [TRY1_RAT]	2,00

**Πίνακας Παραρτήματος 8:** Διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση στα SHR ζώα 13 εβδομάδων όπως προέκυψε από την ανάλυση του νεφρικού παρεγχύματος με LC-MS/MS. Το στατιστικό τεστ Mann-Whitney χρησιμοποιήθηκε. Όλες οι τιμές είναι στατιστικά σημαντικές με  $p < 0.05$

Κωδικός	Πρωτεΐνη	Λόγος Έκφρασης (SHR/WKY)
P09456	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit OS=Rattus norvegicus GN=Prkar1a PE=1 SV=2 - [KAP0_RAT]	0,50
P62755	40S ribosomal protein S6 OS=Rattus norvegicus GN=Rps6 PE=1 SV=1 - [RS6_RAT]	0,50
P20759	Ig gamma-1 chain C region OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=1 - [IGHG1_RAT]	0,49
P16391	RT1 class I histocompatibility antigen, AA alpha chain OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2 - [HA12_RAT]	0,49
Q99376	Transferrin receptor protein 1 (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Tfrc PE=2 SV=1 - [TFR1_RAT]	0,49
Q9Z0V6	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Prdx3 PE=1 SV=2 - [PRDX3_RAT]	0,49
P61805	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit DAD1 OS=Rattus norvegicus GN=Dad1 PE=3 SV=3 - [DAD1_RAT]	0,49
P51583	Multifunctional protein ADE2 OS=Rattus norvegicus GN=Paics PE=2 SV=3 - [PUR6_RAT]	0,49
Q6XQN1	Nicotinate phosphoribosyltransferase OS=Rattus norvegicus GN=Naprt PE=2 SV=1 - [PNCB_RAT]	0,49
G3V9R8	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpc PE=1 SV=2 - [HNRPC_RAT]	0,49
O35413	Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Sorbs2 PE=1 SV=2 - [SRBS2_RAT]	0,48
Q78P75	Dynein light chain 2, cytoplasmic OS=Rattus norvegicus GN=Dynll2 PE=1 SV=1 - [DYL2_RAT]	0,48
P04639	Apolipoprotein A-I OS=Rattus norvegicus GN=Apoa1 PE=1 SV=2 - [APOA1_RAT]	0,48
P27952	40S ribosomal protein S2 OS=Rattus norvegicus GN=Rps2 PE=1 SV=1 - [RS2_RAT]	0,48
Q5I0L3	Tyrosine--tRNA ligase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Yars2 PE=2 SV=1 - [SYYM_RAT]	0,48
P84817	Mitochondrial fission 1 protein OS=Rattus norvegicus GN=Fis1 PE=1 SV=1 - [FIS1_RAT]	0,48
Q63481	Ras-related protein Rab-7L1 OS=Rattus norvegicus GN=Rab29 PE=1 SV=1 - [RAB7L_RAT]	0,48
Q5U2R7	LDLR chaperone MESD OS=Rattus norvegicus GN=Mesdc2 PE=2 SV=1 - [MESD_RAT]	0,47
Q7M0E3	Dextrin OS=Rattus norvegicus GN=Dstn PE=1 SV=3 - [DEST_RAT]	0,47

<b>Q9JHL4</b>	Drebrin-like protein OS=Rattus norvegicus GN=Dbnl PE=1 SV=1 - [DBNL_RAT]	0,47
<b>P21571</b>	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5j PE=1 SV=1 - [ATP5J_RAT]	0,47
<b>D4AAT7</b>	ATP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase OS=Rattus norvegicus GN=Carkd PE=3 SV=1 - [NNRD_RAT]	0,47
<b>Q9WUC4</b>	Copper transport protein ATOX1 OS=Rattus norvegicus GN=Atox1 PE=1 SV=1 - [ATOX1_RAT]	0,47
<b>P05708</b>	Hexokinase-1 OS=Rattus norvegicus GN=Hk1 PE=1 SV=4 - [HXK1_RAT]	0,46
<b>P20069</b>	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha OS=Rattus norvegicus GN=Pmpca PE=1 SV=1 - [MPPA_RAT]	0,46
<b>Q6MGB5</b>	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8 OS=Rattus norvegicus GN=Hsd17b8 PE=3 SV=1 - [DHB8_RAT]	0,46
<b>P52296</b>	Importin subunit beta-1 OS=Rattus norvegicus GN=Kpnb1 PE=1 SV=1 - [IMB1_RAT]	0,46
<b>Q920A6</b>	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase OS=Rattus norvegicus GN=Scepe1 PE=2 SV=1 - [RISC_RAT]	0,46
<b>Q9ERE6</b>	Myosin phosphatase Rho-interacting protein OS=Rattus norvegicus GN=Mprip PE=2 SV=1 - [MPRIP_RAT]	0,46
<b>P63095</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short OS=Rattus norvegicus GN=Gnas PE=1 SV=1 - [GNAS2_RAT]	0,46
<b>Q9WVB1</b>	Ras-related protein Rab-6A OS=Rattus norvegicus GN=Rab6a PE=2 SV=2 - [RAB6A_RAT]	0,46
<b>Q5XIP9</b>	Transmembrane protein 43 OS=Rattus norvegicus GN=Tmem43 PE=2 SV=1 - [TMM43_RAT]	0,45
<b>Q01177</b>	Plasminogen OS=Rattus norvegicus GN=Plg PE=2 SV=2 - [PLMN_RAT]	0,45
<b>B0BN18</b>	Prefoldin subunit 2 OS=Rattus norvegicus GN=Pfdn2 PE=2 SV=1 - [PFD2_RAT]	0,45
<b>Q9EQX9</b>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N OS=Rattus norvegicus GN=Ube2n PE=1 SV=1 - [UBE2N_RAT]	0,45
<b>Q641X3</b>	Beta-hexosaminidase subunit alpha OS=Rattus norvegicus GN=Hexa PE=2 SV=1 - [HEXA_RAT]	0,44
<b>P51907</b>	Excitatory amino acid transporter 3 OS=Rattus norvegicus GN=Slc1a1 PE=1 SV=1 - [EAA3_RAT]	0,44
<b>P0C0A2</b>	Vacuolar protein-sorting-associated protein 36 OS=Rattus norvegicus GN=Vps36 PE=1 SV=1 - [VPS36_RAT]	0,44
<b>O35956</b>	Solute carrier family 22 member 6 OS=Rattus norvegicus GN=Slc22a6 PE=1 SV=1 - [S22A6_RAT]	0,44
<b>Q6JE36</b>	Protein NDRG1 OS=Rattus norvegicus GN=Ndrg1 PE=1 SV=1 - [NDRG1_RAT]	0,44
<b>Q6P6R2</b>	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Dld PE=1 SV=1 - [DLDH_RAT]	0,44
<b>Q9WVA1</b>	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A OS=Rattus norvegicus GN=Timm8a PE=1 SV=1 - [TIM8A_RAT]	0,43

<b>Q91XU1</b>	Protein quaking OS=Rattus norvegicus GN=Qki PE=1 SV=2 - [QKI_RAT]	0,43
<b>Q4KM74</b>	Vesicle-trafficking protein SEC22b OS=Rattus norvegicus GN=Sec22b PE=1 SV=3 - [SC22B_RAT]	0,43
<b>Q01984</b>	Histamine N-methyltransferase OS=Rattus norvegicus GN=Hnmt PE=1 SV=3 - [HNMT_RAT]	0,43
<b>P28494</b>	Alpha-mannosidase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Man2a1 PE=1 SV=2 - [MA2A1_RAT]	0,43
<b>P08460</b>	Nidogen-1 (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Nid1 PE=1 SV=2 - [NID1_RAT]	0,42
<b>Q923V4</b>	F-box only protein 6 OS=Rattus norvegicus GN=Fbxo6 PE=2 SV=1 - [FBX6_RAT]	0,42
<b>P50430</b>	Arylsulfatase B OS=Rattus norvegicus GN=Arsb PE=2 SV=2 - [ARSB_RAT]	0,42
<b>Q5EBA1</b>	ATP-dependent RNA helicase SUPV3L1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Supv3l1 PE=2 SV=1 - [SUV3_RAT]	0,42
<b>P12346</b>	Serotransferrin OS=Rattus norvegicus GN=Tf PE=1 SV=3 - [TRFE_RAT]	0,42
<b>B2RYM5</b>	Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36 OS=Rattus norvegicus GN=Brcc3 PE=2 SV=1 - [BRCC3_RAT]	0,41
<b>P04638</b>	Apolipoprotein A-II OS=Rattus norvegicus GN=Apoa2 PE=2 SV=1 - [APOA2_RAT]	0,41
<b>Q8K4M9</b>	Oxysterol-binding protein-related protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Osbp1a PE=1 SV=1 - [OSBL1_RAT]	0,41
<b>Q64605</b>	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S OS=Rattus norvegicus GN=Ptpsr PE=1 SV=2 - [PTPRS_RAT]	0,41
<b>O88867</b>	Kynurenine 3-monooxygenase OS=Rattus norvegicus GN=Kmo PE=1 SV=1 - [KMO_RAT]	0,41
<b>Q4G061</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B OS=Rattus norvegicus GN=Eif3b PE=1 SV=1 - [EIF3B_RAT]	0,40
<b>Q496Z0</b>	Elongator complex protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Elp2 PE=2 SV=1 - [ELP2_RAT]	0,40
<b>Q99N27</b>	Sorting nexin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Snx1 PE=1 SV=1 - [SNX1_RAT]	0,40
<b>P10959</b>	Carboxylesterase 1C OS=Rattus norvegicus GN=Ces1c PE=1 SV=3 - [EST1C_RAT]	0,40
<b>Q4KLL0</b>	Transcription elongation factor A protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Tcea1 PE=2 SV=1 - [TCEA1_RAT]	0,40
<b>Q99N37</b>	Rho GTPase-activating protein 17 OS=Rattus norvegicus GN=Arhgap17 PE=1 SV=1 - [RHG17_RAT]	0,40
<b>Q5M819</b>	Phosphoserine phosphatase OS=Rattus norvegicus GN=Psphe PE=2 SV=1 - [SERB_RAT]	0,40
<b>D3ZHA0</b>	Filamin-C OS=Rattus norvegicus GN=Flnc PE=1 SV=1 - [FLNC_RAT]	0,40
<b>A2VD12</b>	Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pbxip1 PE=2 SV=1 - [PBIP1_RAT]	0,40
<b>P26819</b>	Beta-adrenergic receptor kinase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Adrbk2 PE=2 SV=1 - [ARBK2_RAT]	0,40

<b>Q5FVI6</b>	V-type proton ATPase subunit C 1 OS=Rattus norvegicus GN=Atp6v1c1 PE=2 SV=1 - [VATC1_RAT]	0,39
<b>P02651</b>	Apolipoprotein A-IV OS=Rattus norvegicus GN=Apoa4 PE=2 SV=2 - [APOA4_RAT]	0,39
<b>P43244</b>	Matrin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Matr3 PE=1 SV=2 - [MATR3_RAT]	0,39
<b>Q63798</b>	Proteasome activator complex subunit 2 OS=Rattus norvegicus GN=Psme2 PE=2 SV=3 - [PSME2_RAT]	0,39
<b>Q9EPB1</b>	Dipeptidyl peptidase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Dpp7 PE=1 SV=1 - [DPP2_RAT]	0,39
<b>P51796</b>	H(+)/Cl(-) exchange transporter 5 OS=Rattus norvegicus GN=Clcn5 PE=2 SV=1 - [CLCN5_RAT]	0,38
<b>P62250</b>	40S ribosomal protein S16 OS=Rattus norvegicus GN=Rps16 PE=1 SV=2 - [RS16_RAT]	0,38
<b>Q3B8Q0</b>	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2 OS=Rattus norvegicus GN=Mapre2 PE=2 SV=1 - [MARE2_RAT]	0,38
<b>Q5QJC9</b>	BAG family molecular chaperone regulator 5 OS=Rattus norvegicus GN=Bag5 PE=1 SV=1 - [BAG5_RAT]	0,38
<b>P51886</b>	Lumican OS=Rattus norvegicus GN=Lum PE=2 SV=1 - [LUM_RAT]	0,38
<b>P62902</b>	60S ribosomal protein L31 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl31 PE=2 SV=1 - [RL31_RAT]	0,37
<b>B5DFN3</b>	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 2 OS=Rattus norvegicus GN=Uqcc2 PE=2 SV=1 - [UQCC2_RAT]	0,37
<b>D3ZCL3</b>	U1 small nuclear ribonucleoprotein C OS=Rattus norvegicus GN=Snrpc PE=3 SV=1 - [RU1C_RAT]	0,36
<b>P02761</b>	Major urinary protein OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=1 - [MUP_RAT]	0,36
<b>P13264</b>	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Gls PE=1 SV=2 - [GLSK_RAT]	0,35
<b>Q9WTW7</b>	Solute carrier family 23 member 1 OS=Rattus norvegicus GN=Slc23a1 PE=2 SV=1 - [S23A1_RAT]	0,35
<b>P29314</b>	40S ribosomal protein S9 OS=Rattus norvegicus GN=Rps9 PE=1 SV=4 - [RS9_RAT]	0,35
<b>P48284</b>	Carbonic anhydrase 4 OS=Rattus norvegicus GN=Ca4 PE=1 SV=1 - [CAH4_RAT]	0,35
<b>O55166</b>	Vacuolar protein sorting-associated protein 52 homolog OS=Rattus norvegicus GN=Vps52 PE=2 SV=2 - [VPS52_RAT]	0,34
<b>Q63663</b>	Interferon-induced guanylate-binding protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Gbp2 PE=1 SV=2 - [GBP2_RAT]	0,34
<b>Q5BJX1</b>	39S ribosomal protein L41, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Mrpl41 PE=1 SV=1 - [RM41_RAT]	0,34
<b>F1M7Y5</b>	Protein kinase C iota type OS=Rattus norvegicus GN=Prkci PE=1 SV=1 - [KPCI_RAT]	0,34
<b>P17046</b>	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Lamp2 PE=1 SV=2 - [LAMP2_RAT]	0,33
<b>Q68FT1</b>	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Coq9 PE=2 SV=2 -	0,33



	[COQ9_RAT]	
<b>P05943</b>	Protein S100-A10 OS=Rattus norvegicus GN=S100a10 PE=1 SV=2 - [S10AA_RAT]	0,33
<b>P41499</b>	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 OS=Rattus norvegicus GN=Ptpn11 PE=1 SV=4 - [PTN11_RAT]	0,33
<b>Q4KLF8</b>	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5 OS=Rattus norvegicus GN=Arpc5 PE=1 SV=3 - [ARPC5_RAT]	0,33
<b>P23711</b>	Heme oxygenase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Hmox2 PE=1 SV=1 - [HMOX2_RAT]	0,31
<b>P55009</b>	Allograft inflammatory factor 1 OS=Rattus norvegicus GN=Aif1 PE=2 SV=1 - [AIF1_RAT]	0,31
<b>Q6AXX6</b>	Redox-regulatory protein FAM213A OS=Rattus norvegicus GN=Fam213a PE=1 SV=1 - [F213A_RAT]	0,31
<b>Q7M0E7</b>	39S ribosomal protein L14, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Mrpl14 PE=1 SV=2 - [RM14_RAT]	0,31
<b>F1M3L7</b>	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8 OS=Rattus norvegicus GN=Eps8 PE=1 SV=2 - [EPS8_RAT]	0,31
<b>Q6P7P5</b>	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bzw1 PE=2 SV=1 - [BZW1_RAT]	0,31
<b>O35795</b>	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Entpd2 PE=1 SV=1 - [ENTP2_RAT]	0,30
<b>Q68FX9</b>	NAD-dependent protein deacylase sirtuin-5, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Sirt5 PE=2 SV=1 - [SIR5_RAT]	0,29
<b>Q8VHE9</b>	All-trans-retinol 13,14-reductase OS=Rattus norvegicus GN=Retsat PE=2 SV=1 - [RETST_RAT]	0,28
<b>P62425</b>	60S ribosomal protein L7a OS=Rattus norvegicus GN=Rpl7a PE=1 SV=2 - [RL7A_RAT]	0,27
<b>Q9NQR8</b>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 4 OS=Rattus norvegicus GN=Ndufaf4 PE=1 SV=1 - [NDUF4_RAT]	0,27
<b>P17164</b>	Tissue alpha-L-fucosidase OS=Rattus norvegicus GN=Fuca1 PE=1 SV=1 - [FUCO_RAT]	0,27
<b>P70645</b>	Bleomycin hydrolase OS=Rattus norvegicus GN=Blmh PE=1 SV=1 - [BLMH_RAT]	0,26
<b>P39032</b>	60S ribosomal protein L36 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl36 PE=1 SV=2 - [RL36_RAT]	0,25
<b>Q4FZY0</b>	EF-hand domain-containing protein D2 OS=Rattus norvegicus GN=Efhd2 PE=1 SV=1 - [EFHD2_RAT]	0,23
<b>Q64604</b>	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F OS=Rattus norvegicus GN=Ptpnf PE=2 SV=1 - [PTPRF_RAT]	0,23
<b>Q9EQV6</b>	Tripeptidyl-peptidase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Tpp1 PE=1 SV=1 - [TPP1_RAT]	0,23
<b>P50878</b>	60S ribosomal protein L4 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl4 PE=1 SV=3 - [RL4_RAT]	0,23
<b>P43278</b>	Histone H1.0 OS=Rattus norvegicus GN=H1f0 PE=2 SV=2 - [H10_RAT]	0,22
<b>Q6AYR6</b>	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Hdhd2 PE=2 SV=1 - [HDHD2_RAT]	0,21

<b>P42346</b>	Serine/threonine-protein kinase mTOR OS=Rattus norvegicus GN=Mtor PE=1 SV=1 - [MTOR_RAT]	0,21
<b>O35889</b>	Afadin OS=Rattus norvegicus GN=Mllt4 PE=1 SV=1 - [AFAD_RAT]	0,21
<b>Q9Z1X1</b>	Extended synaptotagmin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Esyt1 PE=2 SV=1 - [ESYT1_RAT]	0,21
<b>Q6P7R8</b>	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase OS=Rattus norvegicus GN=Hsd17b12 PE=2 SV=1 - [DHB12_RAT]	0,21
<b>Q9EST6</b>	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B OS=Rattus norvegicus GN=Anp32b PE=2 SV=1 - [AN32B_RAT]	0,19
<b>Q6PEC0</b>	Bis(5'-nucleosyl)-tetraphosphatase [asymmetrical] OS=Rattus norvegicus GN=Nudt2 PE=2 SV=3 - [AP4A_RAT]	0,19
<b>P04905</b>	Glutathione S-transferase Mu 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm1 PE=1 SV=2 - [GSTM1_RAT]	0,16
<b>Q3B7D1</b>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Z OS=Rattus norvegicus GN=Ube2z PE=2 SV=2 - [UBE2Z_RAT]	0,16
<b>P17136</b>	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Snrpb PE=2 SV=1 - [RSMB_RAT]	0,14
<b>Q562C6</b>	Leucine zipper transcription factor-like protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Lztf11 PE=2 SV=1 - [LZTL1_RAT]	0,13
<b>Q5BKD0</b>	Inactive 2'-5'-oligoadenylate synthase 1B OS=Rattus norvegicus GN=Oas1b PE=2 SV=1 - [OAS1B_RAT]	0,13
<b>Q9JIL3</b>	Interleukin enhancer-binding factor 3 OS=Rattus norvegicus GN=Ilf3 PE=1 SV=2 - [ILF3_RAT]	0,08
<b>Q9Z1N4</b>	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bpnt1 PE=1 SV=1 - [BPNT1_RAT]	0,03

**Πίνακας Παραρτήματος 9:** Διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στα SHR ζώα 20 εβδομάδων όπως προέκυψε από την ανάλυση του νεφρικού παρεγχύματος με LC-MS/MS. Το στατιστικό τεστ Mann-Whitney χρησιμοποιήθηκε. Όλες οι τιμές είναι στατιστικά σημαντικές με  $p < 0.05$

Κωδικός	Πρωτεΐνη	Λόγος Έκφρασης (SHR/WKY)
<b>Q7TQ16</b>	Cytochrome b-c1 complex subunit 8 OS=Rattus norvegicus GN=Uqcrq PE=3 SV=1 - [QCR8_RAT]	160,60
<b>Q6SKG1</b>	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM3, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acsm3 PE=2 SV=1 - [ACSM3_RAT]	28,47
<b>Q6PEC1</b>	Tubulin-specific chaperone A OS=Rattus norvegicus GN=Tbca PE=1 SV=1 - [TBCA_RAT]	21,71
<b>P20761</b>	Ig gamma-2B chain C region OS=Rattus norvegicus GN=Igh-1a PE=1 SV=1 - [IGG2B_RAT]	17,82
<b>P28075</b>	Proteasome subunit beta type-5 OS=Rattus norvegicus GN=Psm5 PE=1 SV=3 - [PSB5_RAT]	15,58
<b>Q5XI72</b>	Eukaryotic translation initiation factor 4H OS=Rattus norvegicus GN=Eif4h PE=1 SV=1 - [IF4H_RAT]	13,72
<b>Q5U2P1</b>	Metal transporter CNNM2 OS=Rattus norvegicus GN=Cnm2 PE=2 SV=1 - [CNM2_RAT]	12,91
<b>Q00566</b>	Methyl-CpG-binding protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Mecp2 PE=1 SV=1 - [MECP2_RAT]	11,06
<b>P22509</b>	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin OS=Rattus norvegicus GN=Fbl PE=1 SV=2 - [FBRL_RAT]	10,99
<b>P53792</b>	Sodium/glucose cotransporter 2 OS=Rattus norvegicus GN=Slc5a2 PE=2 SV=1 - [SC5A2_RAT]	9,63
<b>P42346</b>	Serine/threonine-protein kinase mTOR OS=Rattus norvegicus GN=Mtor PE=1 SV=1 - [MTOR_RAT]	8,79
<b>P04692</b>	Tropomyosin alpha-1 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm1 PE=1 SV=3 - [TPM1_RAT]	8,61
<b>Q62902</b>	Protein ERGIC-53 OS=Rattus norvegicus GN=Lman1 PE=1 SV=1 - [LMAN1_RAT]	8,35
<b>Q00972</b>	[3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase [lipoamide]] kinase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Bckdk PE=1 SV=2 - [BCKD_RAT]	8,19
<b>Q9Z0V5</b>	Peroxiredoxin-4 OS=Rattus norvegicus GN=Prdx4 PE=2 SV=1 - [PRDX4_RAT]	7,81
<b>P20650</b>	Protein phosphatase 1A OS=Rattus norvegicus GN=Ppm1a PE=1 SV=1 - [PPM1A_RAT]	7,52
<b>Q9WU49</b>	Calcium-regulated heat stable protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Carhsp1 PE=1 SV=1 - [CHSP1_RAT]	7,15
<b>Q9QYL8</b>	Acyl-protein thioesterase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Lypla2 PE=1 SV=1 - [LYPA2_RAT]	7,15
<b>Q4V8K5</b>	BRO1 domain-containing protein BROX OS=Rattus norvegicus GN=Brox PE=2 SV=1 - [BROX_RAT]	6,96

<b>Q5XFW8</b>	Protein SEC13 homolog OS=Rattus norvegicus GN=Sec13 PE=1 SV=1 - [SEC13_RAT]	6,60
<b>D4A929</b>	WD repeat-containing protein 81 OS=Rattus norvegicus GN=Wdr81 PE=3 SV=1 - [WDR81_RAT]	6,43
<b>Q62687</b>	Sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT3 OS=Rattus norvegicus GN=Slc6a18 PE=2 SV=1 - [S6A18_RAT]	6,26
<b>Q9EQT5</b>	Tubulointerstitial nephritis antigen-like OS=Rattus norvegicus GN=Tinagl1 PE=2 SV=1 - [TINAL_RAT]	6,23
<b>Q5I0E9</b>	Multidrug and toxin extrusion protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Slc47a1 PE=1 SV=1 - [S47A1_RAT]	6,22
<b>Q7TP52</b>	Carboxymethylglutaminase homolog OS=Rattus norvegicus GN=Cmb1 PE=2 SV=1 - [CMBL_RAT]	5,87
<b>P70618</b>	Mitogen-activated protein kinase 14 OS=Rattus norvegicus GN=Mapk14 PE=2 SV=3 - [MK14_RAT]	5,57
<b>Q05982</b>	Nucleoside diphosphate kinase A OS=Rattus norvegicus GN=Nme1 PE=1 SV=1 - [NDKA_RAT]	5,52
<b>P30835</b>	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type OS=Rattus norvegicus GN=Pfkl PE=2 SV=3 - [PFKAL_RAT]	5,42
<b>Q02589</b>	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase OS=Rattus norvegicus GN=Adprh PE=1 SV=2 - [ADPRH_RAT]	5,33
<b>Q2TL32</b>	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4 OS=Rattus norvegicus GN=Ubr4 PE=1 SV=2 - [UBR4_RAT]	5,28
<b>F1LM93</b>	Tyrosine-protein kinase Yes OS=Rattus norvegicus GN=Yes1 PE=1 SV=1 - [YES_RAT]	5,26
<b>P62749</b>	Hippocalcin-like protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Hpcal1 PE=1 SV=2 - [HPCL1_RAT]	5,26
<b>Q5XJW2</b>	Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gadd45gip1 PE=2 SV=2 - [G45IP_RAT]	5,25
<b>O88202</b>	60 kDa lysophospholipase OS=Rattus norvegicus GN=Aspg PE=1 SV=1 - [LPP60_RAT]	4,95
<b>Q91Y78</b>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3 OS=Rattus norvegicus GN=Uchl3 PE=1 SV=1 - [UCHL3_RAT]	4,89
<b>O55159</b>	Epithelial cell adhesion molecule OS=Rattus norvegicus GN=Epcam PE=1 SV=1 - [EPCAM_RAT]	4,89
<b>P13255</b>	Glycine N-methyltransferase OS=Rattus norvegicus GN=Gnmt PE=1 SV=2 - [GNMT_RAT]	4,79
<b>Q62952</b>	Dihydropyrimidinase-related protein 3 OS=Rattus norvegicus GN=Dpysl3 PE=1 SV=2 - [DPYL3_RAT]	4,66
<b>Q07116</b>	Sulfite oxidase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Suox PE=1 SV=2 - [SUOX_RAT]	4,54
<b>Q66HL2</b>	Src substrate cortactin OS=Rattus norvegicus GN=Ctnn PE=1 SV=1 - [SRC8_RAT]	4,40
<b>Q3B7U9</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8 OS=Rattus norvegicus GN=Fkbp8 PE=2 SV=1 - [FKBP8_RAT]	4,37
<b>Q66H59</b>	N-acetylneuraminase OS=Rattus norvegicus GN=Npl PE=2 SV=1 - [NPL_RAT]	4,33

<b>Q64633</b>	UDP-glucuronosyltransferase 1-7 OS=Rattus norvegicus GN=Ugt1a7c PE=2 SV=1 - [UD17_RAT]	4,33
<b>Q8VI04</b>	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase OS=Rattus norvegicus GN=Asrgl1 PE=1 SV=1 - [ASGL1_RAT]	4,32
<b>Q4QQW3</b>	Hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Adhfe1 PE=1 SV=1 - [HOT_RAT]	4,28
<b>Q91ZW6</b>	Trimethyllysine dioxygenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Tmlhe PE=1 SV=2 - [TMLH_RAT]	4,28
<b>P80386</b>	5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-1 OS=Rattus norvegicus GN=Prkab1 PE=1 SV=4 - [AAKB1_RAT]	4,25
<b>Q6AYB4</b>	Heat shock 70 kDa protein 14 OS=Rattus norvegicus GN=Hspa14 PE=2 SV=1 - [HSP7E_RAT]	4,22
<b>Q6MG60</b>	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Ddah2 PE=1 SV=1 - [DDAH2_RAT]	4,13
<b>P08424</b>	Renin OS=Rattus norvegicus GN=Ren1 PE=2 SV=2 - [RENI_RAT]	4,09
<b>P42676</b>	Neurolysin, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Nln PE=1 SV=1 - [NEUL_RAT]	4,07
<b>Q66HG5</b>	Transmembrane 9 superfamily member 2 OS=Rattus norvegicus GN=Tm9sf2 PE=2 SV=1 - [TM9S2_RAT]	4,01
<b>P63031</b>	Mitochondrial pyruvate carrier 1 OS=Rattus norvegicus GN=Mpc1 PE=3 SV=1 - [MPC1_RAT]	3,98
<b>Q04679</b>	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit gamma OS=Rattus norvegicus GN=Fxyd2 PE=2 SV=2 - [ATNG_RAT]	3,98
<b>P18420</b>	Proteasome subunit alpha type-1 OS=Rattus norvegicus GN=Psma1 PE=1 SV=2 - [PSA1_RAT]	3,94
<b>Q05962</b>	ADP/ATP translocase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Slc25a4 PE=1 SV=3 - [ADT1_RAT]	3,91
<b>P07895</b>	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Sod2 PE=1 SV=2 - [SODM_RAT]	3,88
<b>Q6AYF4</b>	Integrin beta-6 OS=Rattus norvegicus GN=Itgb6 PE=2 SV=1 - [ITB6_RAT]	3,82
<b>F1LYQ8</b>	FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Farp1 PE=1 SV=2 - [FARP1_RAT]	3,75
<b>Q32PX2</b>	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Aimp2 PE=2 SV=1 - [AIMP2_RAT]	3,75
<b>O70594</b>	Solute carrier family 22 member 5 OS=Rattus norvegicus GN=Slc22a5 PE=1 SV=1 - [S22A5_RAT]	3,74
<b>P08289</b>	Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme OS=Rattus norvegicus GN=Alpl PE=1 SV=2 - [PPBT_RAT]	3,74
<b>P21588</b>	5'-nucleotidase OS=Rattus norvegicus GN=Nt5e PE=1 SV=1 - [5NTD_RAT]	3,73

<b>P21533</b>	60S ribosomal protein L6 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl6 PE=1 SV=5 - [RL6_RAT]	3,72
<b>Q9WV25</b>	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 OS=Rattus norvegicus GN=Puf60 PE=2 SV=2 - [PUF60_RAT]	3,66
<b>P10111</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Rattus norvegicus GN=Ppia PE=1 SV=2 - [PPIA_RAT]	3,64
<b>Q920L2</b>	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Sdha PE=1 SV=1 - [SDHA_RAT]	3,63
<b>Q91ZQ0</b>	Vacuole membrane protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Vmp1 PE=1 SV=1 - [VMP1_RAT]	3,60
<b>Q63610</b>	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm3 PE=1 SV=2 - [TPM3_RAT]	3,56
<b>Q05096</b>	Unconventional myosin-Ib OS=Rattus norvegicus GN=Myo1b PE=1 SV=1 - [MYO1B_RAT]	3,49
<b>B0BNF1</b>	Septin-8 OS=Rattus norvegicus GN=Sept8 PE=1 SV=1 - [SEPT8_RAT]	3,44
<b>Q9WVJ4</b>	Synaptojanin-2-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=Synj2bp PE=1 SV=2 - [SYJ2B_RAT]	3,42
<b>P42930</b>	Heat shock protein beta-1 OS=Rattus norvegicus GN=Hspb1 PE=1 SV=1 - [HSPB1_RAT]	3,41
<b>P14942</b>	Glutathione S-transferase alpha-4 OS=Rattus norvegicus GN=Gsta4 PE=1 SV=2 - [GSTA4_RAT]	3,38
<b>P55161</b>	Nck-associated protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Nckap1 PE=2 SV=1 - [NCKP1_RAT]	3,38
<b>P86410</b>	Ral GTPase-activating protein subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Ralgapb PE=1 SV=1 - [RLGPB_RAT]	3,32
<b>Q921A4</b>	Cytoglobin OS=Rattus norvegicus GN=Cygb PE=1 SV=1 - [CYGB_RAT]	3,30
<b>Q6P9U8</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H OS=Rattus norvegicus GN=Eif3h PE=2 SV=1 - [EIF3H_RAT]	3,30
<b>A1L108</b>	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein OS=Rattus norvegicus GN=Arpc5l PE=1 SV=2 - [ARP5L_RAT]	3,26
<b>Q6P686</b>	Osteoclast-stimulating factor 1 OS=Rattus norvegicus GN=Ostf1 PE=2 SV=1 - [OSTF1_RAT]	3,23
<b>P00762</b>	Anionic trypsin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Prss1 PE=1 SV=1 - [TRY1_RAT]	3,22
<b>P06349</b>	Histone H1t OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h1t PE=1 SV=2 - [H1T_RAT]	3,21
<b>Q62839</b>	Golgin subfamily A member 2 OS=Rattus norvegicus GN=Golga2 PE=1 SV=3 - [GOGA2_RAT]	3,21
<b>P62898</b>	Cytochrome c, somatic OS=Rattus norvegicus GN=Cycc PE=1 SV=2 - [CYC_RAT]	3,18
<b>Q63356</b>	Unconventional myosin-Ie OS=Rattus norvegicus GN=Myo1e PE=1 SV=1 - [MYO1E_RAT]	3,11
<b>Q9WUH4</b>	Four and a half LIM domains protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Fhl1 PE=2 SV=1 - [FHL1_RAT]	3,10
<b>P62944</b>	AP-2 complex subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Ap2b1 PE=1 SV=1 - [AP2B1_RAT]	3,10

<b>Q704E8</b>	ATP-binding cassette sub-family B member 7, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Abcb7 PE=1 SV=1 - [ABCB7_RAT]	3,07
<b>P13832</b>	Myosin regulatory light chain RLC-A OS=Rattus norvegicus GN=Rlc-a PE=2 SV=2 - [MRLCA_RAT]	3,04
<b>P00502</b>	Glutathione S-transferase alpha-1 OS=Rattus norvegicus GN=Gsta1 PE=1 SV=3 - [GSTA1_RAT]	3,03
<b>Q9R0W2</b>	Solute carrier family 22 member 2 OS=Rattus norvegicus GN=Slc22a2 PE=1 SV=1 - [S22A2_RAT]	3,03
<b>P20817</b>	Cytochrome P450 4A14 OS=Rattus norvegicus GN=Cyp4a14 PE=1 SV=2 - [CP4AE_RAT]	3,01
<b>P81795</b>	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3 OS=Rattus norvegicus GN=Eif2s3 PE=1 SV=2 - [IF2G_RAT]	3,00
<b>Q9WVK3</b>	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase OS=Rattus norvegicus GN=Pecr PE=2 SV=1 - [PECR_RAT]	2,99
<b>O08651</b>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Phgdh PE=1 SV=3 - [SERA_RAT]	2,99
<b>Q642A7</b>	Protein FAM151A OS=Rattus norvegicus GN=Fam151a PE=2 SV=1 - [F151A_RAT]	2,99
<b>P50137</b>	Transketolase OS=Rattus norvegicus GN=Tkt PE=1 SV=1 - [TKT_RAT]	2,91
<b>P10868</b>	Guanidinoacetate N-methyltransferase OS=Rattus norvegicus GN=Gamt PE=1 SV=2 - [GAMT_RAT]	2,90
<b>O35413</b>	Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Sorbs2 PE=1 SV=2 - [SRBS2_RAT]	2,90
<b>P18421</b>	Proteasome subunit beta type-1 OS=Rattus norvegicus GN=Psmb1 PE=1 SV=3 - [PSB1_RAT]	2,89
<b>P09495</b>	Tropomyosin alpha-4 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm4 PE=1 SV=3 - [TPM4_RAT]	2,88
<b>Q9R141</b>	Solute carrier family 22 member 4 OS=Rattus norvegicus GN=Slc22a4 PE=1 SV=1 - [S22A4_RAT]	2,88
<b>Q9Z339</b>	Glutathione S-transferase omega-1 OS=Rattus norvegicus GN=Gsto1 PE=1 SV=2 - [GSTO1_RAT]	2,87
<b>Q6Q7Y5</b>	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13 OS=Rattus norvegicus GN=Gna13 PE=1 SV=1 - [GNA13_RAT]	2,87
<b>O35832</b>	Cyclin-dependent kinase 18 OS=Rattus norvegicus GN=Cdk18 PE=1 SV=1 - [CKD18_RAT]	2,86
<b>Q9WVA1</b>	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A OS=Rattus norvegicus GN=Timm8a PE=1 SV=1 - [TIM8A_RAT]	2,85
<b>P17988</b>	Sulfotransferase 1A1 OS=Rattus norvegicus GN=Sult1a1 PE=1 SV=1 - [ST1A1_RAT]	2,84
<b>P48284</b>	Carbonic anhydrase 4 OS=Rattus norvegicus GN=Ca4 PE=1 SV=1 - [CAH4_RAT]	2,80
<b>Q5XIC2</b>	Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ecsit PE=1 SV=1 - [ECSIT_RAT]	2,79
<b>P23928</b>	Alpha-crystallin B chain OS=Rattus norvegicus GN=Cryab PE=1 SV=1 - [CRYAB_RAT]	2,79

<b>Q62871</b>	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2 OS=Rattus norvegicus GN=Dync1i2 PE=1 SV=1 - [DC1I2_RAT]	2,78
<b>P02770</b>	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	2,76
<b>B2GUZ5</b>	F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Rattus norvegicus GN=Capza1 PE=1 SV=1 - [CAZA1_RAT]	2,75
<b>P07632</b>	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Rattus norvegicus GN=Sod1 PE=1 SV=2 - [SODC_RAT]	2,72
<b>Q63009</b>	Protein arginine N-methyltransferase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Prmt1 PE=1 SV=1 - [ANM1_RAT]	2,70
<b>P86252</b>	Transcriptional activator protein Pur-alpha (Fragments) OS=Rattus norvegicus GN=Pura PE=1 SV=1 - [PURA_RAT]	2,68
<b>B0BNC9</b>	Quinone oxidoreductase-like protein 2 OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=1 - [QORL2_RAT]	2,67
<b>Q99PW3</b>	Sialidase-1 OS=Rattus norvegicus GN=Neu1 PE=1 SV=1 - [NEUR1_RAT]	2,67
<b>Q9WV97</b>	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9 OS=Rattus norvegicus GN=Timm9 PE=1 SV=3 - [TIM9_RAT]	2,67
<b>P50554</b>	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Abat PE=1 SV=3 - [GABT_RAT]	2,65
<b>Q5BK32</b>	FAS-associated factor 2 OS=Rattus norvegicus GN=Faf2 PE=2 SV=1 - [FAF2_RAT]	2,64
<b>Q68FS4</b>	Cytosol aminopeptidase OS=Rattus norvegicus GN=Lap3 PE=1 SV=1 - [AMPL_RAT]	2,64
<b>Q6AXQ0</b>	SUMO-activating enzyme subunit 1 OS=Rattus norvegicus GN=Sae1 PE=2 SV=1 - [SAE1_RAT]	2,62
<b>Q8VHF5</b>	Citrate synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cs PE=1 SV=1 - [CISY_RAT]	2,61
<b>Q6AXR4</b>	Beta-hexosaminidase subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Hexb PE=2 SV=1 - [HEXB_RAT]	2,60
<b>P14740</b>	Dipeptidyl peptidase 4 OS=Rattus norvegicus GN=Dpp4 PE=1 SV=2 - [DPP4_RAT]	2,60
<b>P97700</b>	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein OS=Rattus norvegicus GN=Slc25a11 PE=2 SV=3 - [M2OM_RAT]	2,59
<b>Q8R478</b>	WW domain-binding protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Wbp2 PE=1 SV=1 - [WBP2_RAT]	2,57
<b>Q5BK62</b>	Protein Mpv17 OS=Rattus norvegicus GN=Mpv17 PE=2 SV=1 - [MPV17_RAT]	2,57
<b>B0K020</b>	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Cisd1 PE=3 SV=1 - [CISD1_RAT]	2,56
<b>P56522</b>	NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Fdxr PE=1 SV=1 - [ADRO_RAT]	2,56
<b>Q7TQ94</b>	Nitrilase homolog 1 OS=Rattus norvegicus GN=Nit1 PE=2 SV=1 - [NIT1_RAT]	2,56



<b>Q6PEC4</b>	S-phase kinase-associated protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Skp1 PE=2 SV=3 - [SKP1_RAT]	2,54
<b>P04276</b>	Vitamin D-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=Gc PE=1 SV=3 - [VTDB_RAT]	2,53
<b>P29410</b>	Adenylate kinase 2, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ak2 PE=2 SV=2 - [KAD2_RAT]	2,52
<b>Q6MGD0</b>	Protein CutA OS=Rattus norvegicus GN=Cuta PE=1 SV=2 - [CUTA_RAT]	2,50
<b>Q76IC5</b>	Pyroglutamyl-peptidase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgpep1 PE=1 SV=1 - [PGPI_RAT]	2,47
<b>P10824</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1 OS=Rattus norvegicus GN=Gnai1 PE=1 SV=3 - [GNAI1_RAT]	2,46
<b>Q641Z8</b>	Peflin OS=Rattus norvegicus GN=Pef1 PE=2 SV=1 - [PEF1_RAT]	2,46
<b>P32551</b>	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Uqcrc2 PE=1 SV=2 - [QCR2_RAT]	2,45
<b>Q5I0J9</b>	Putative L-aspartate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Aspdh PE=2 SV=1 - [ASPD_RAT]	2,44
<b>Q7TS56</b>	Carbonyl reductase family member 4 OS=Rattus norvegicus GN=Cbr4 PE=2 SV=1 - [CBR4_RAT]	2,43
<b>A2VCW9</b>	Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aass PE=2 SV=1 - [AASS_RAT]	2,43
<b>Q8CG45</b>	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2 OS=Rattus norvegicus GN=Akr7a2 PE=1 SV=2 - [ARK72_RAT]	2,43
<b>Q793F9</b>	Vacuolar protein sorting-associated protein 4A OS=Rattus norvegicus GN=Vps4a PE=2 SV=1 - [VPS4A_RAT]	2,43
<b>O54921</b>	Exocyst complex component 2 OS=Rattus norvegicus GN=Exoc2 PE=1 SV=1 - [EXOC2_RAT]	2,42
<b>P57093</b>	Phytanoyl-CoA dioxygenase, peroxisomal OS=Rattus norvegicus GN=Phyh PE=1 SV=2 - [PAHX_RAT]	2,42
<b>Q9Z2Q1</b>	Protein transport protein Sec31A OS=Rattus norvegicus GN=Sec31a PE=1 SV=2 - [SC31A_RAT]	2,40
<b>Q5FVM4</b>	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=Nono PE=1 SV=3 - [NONO_RAT]	2,39
<b>Q9EQV6</b>	Tripeptidyl-peptidase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Tpp1 PE=1 SV=1 - [TPP1_RAT]	2,38
<b>P28073</b>	Proteasome subunit beta type-6 OS=Rattus norvegicus GN=Psb6 PE=1 SV=3 - [PSB6_RAT]	2,38
<b>Q9R1T1</b>	Barrier-to-autointegration factor OS=Rattus norvegicus GN=Banf1 PE=1 SV=1 - [BAF_RAT]	2,36
<b>Q6AYI5</b>	Leucine-rich repeat protein SHOC-2 OS=Rattus norvegicus GN=Shoc2 PE=2 SV=1 - [SHOC2_RAT]	2,34
<b>Q9EQV9</b>	Carboxypeptidase B2 OS=Rattus norvegicus GN=Cpb2 PE=2 SV=1 - [CBPB2_RAT]	2,33
<b>Q63716</b>	Peroxiredoxin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Prdx1 PE=1 SV=1 - [PRDX1_RAT]	2,32

<b>Q3B8Q2</b>	Eukaryotic initiation factor 4A-III OS=Rattus norvegicus GN=Eif4a3 PE=1 SV=1 - [IF4A3_RAT]	2,31
<b>P41498</b>	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase OS=Rattus norvegicus GN=Acp1 PE=1 SV=3 - [PPAC_RAT]	2,31
<b>Q9QYU4</b>	Ketimine reductase mu-crystallin OS=Rattus norvegicus GN=Crym PE=1 SV=1 - [CRYM_RAT]	2,31
<b>D3ZW55</b>	Inosine triphosphate pyrophosphatase OS=Rattus norvegicus GN=Itpa PE=3 SV=1 - [ITPA_RAT]	2,28
<b>Q9Z1E1</b>	Flotillin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Flot1 PE=2 SV=2 - [FLOT1_RAT]	2,28
<b>P62832</b>	60S ribosomal protein L23 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl23 PE=2 SV=1 - [RL23_RAT]	2,26
<b>P63004</b>	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha OS=Rattus norvegicus GN=Pafah1b1 PE=1 SV=2 - [LIS1_RAT]	2,26
<b>Q505J9</b>	ATPase family AAA domain-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Atad1 PE=1 SV=1 - [ATAD1_RAT]	2,26
<b>P85971</b>	6-phosphogluconolactonase OS=Rattus norvegicus GN=Pgls PE=1 SV=1 - [6PGL_RAT]	2,25
<b>Q7TP98</b>	Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Rattus norvegicus GN=Ilf2 PE=2 SV=1 - [ILF2_RAT]	2,24
<b>Q6AXN3</b>	Transmembrane emp24 domain-containing protein 5 OS=Rattus norvegicus GN=Tmed5 PE=2 SV=1 - [TMED5_RAT]	2,24
<b>P61459</b>	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase OS=Rattus norvegicus GN=Pcbd1 PE=1 SV=2 - [PHS_RAT]	2,24
<b>Q66H68</b>	RNA-binding protein 47 OS=Rattus norvegicus GN=Rbm47 PE=2 SV=1 - [RBM47_RAT]	2,23
<b>Q6P799</b>	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Rattus norvegicus GN=Sars PE=1 SV=3 - [SYSC_RAT]	2,22
<b>O88761</b>	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 OS=Rattus norvegicus GN=Psm1 PE=2 SV=1 - [PSMD1_RAT]	2,21
<b>P04041</b>	Glutathione peroxidase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gpx1 PE=1 SV=4 - [GPX1_RAT]	2,20
<b>Q4FZV0</b>	Beta-mannosidase OS=Rattus norvegicus GN=Manba PE=2 SV=1 - [MANBA_RAT]	2,20
<b>P21531</b>	60S ribosomal protein L3 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl3 PE=1 SV=3 - [RL3_RAT]	2,20
<b>P04904</b>	Glutathione S-transferase alpha-3 OS=Rattus norvegicus GN=Gsta3 PE=1 SV=3 - [GSTA3_RAT]	2,18
<b>P17074</b>	40S ribosomal protein S19 OS=Rattus norvegicus GN=Rps19 PE=2 SV=3 - [RS19_RAT]	2,17
<b>O88797</b>	Disabled homolog 2 OS=Rattus norvegicus GN=Dab2 PE=1 SV=1 - [DAB2_RAT]	2,16
<b>O35264</b>	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Pafah1b2 PE=1 SV=1 - [PA1B2_RAT]	2,14
<b>Q568Z6</b>	IST1 homolog OS=Rattus norvegicus GN=Ist1 PE=2 SV=1 - [IST1_RAT]	2,14

<b>Q5XHZ0</b>	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Trap1 PE=1 SV=1 - [TRAP1_RAT]	2,13
<b>P00787</b>	Cathepsin B OS=Rattus norvegicus GN=Ctsb PE=1 SV=2 - [CATB_RAT]	2,13
<b>Q0D2L3</b>	Agmatinase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Agmat PE=2 SV=1 - [SPEB_RAT]	2,13
<b>Q9QYU2</b>	Elongation factor Ts, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Tsfm PE=2 SV=1 - [EFTS_RAT]	2,12
<b>Q63468</b>	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Prpsap1 PE=1 SV=1 - [KPRA_RAT]	2,12
<b>A1A5S1</b>	Pre-mRNA-processing factor 6 OS=Rattus norvegicus GN=Prpf6 PE=2 SV=1 - [PRP6_RAT]	2,12
<b>Q5QJC9</b>	BAG family molecular chaperone regulator 5 OS=Rattus norvegicus GN=Bag5 PE=1 SV=1 - [BAG5_RAT]	2,11
<b>P22791</b>	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hmgcs2 PE=2 SV=1 - [HMCS2_RAT]	2,10
<b>P70502</b>	Solute carrier organic anion transporter family member 1A3 OS=Rattus norvegicus GN=Slco1a3 PE=2 SV=2 - [SO1A3_RAT]	2,10
<b>P19643</b>	Amine oxidase [flavin-containing] B OS=Rattus norvegicus GN=Maob PE=1 SV=3 - [AOFB_RAT]	2,10
<b>Q7TSE9</b>	HCLS1-associated protein X-1 OS=Rattus norvegicus GN=Hax1 PE=1 SV=1 - [HAX1_RAT]	2,10
<b>Q6AYE2</b>	Endophilin-B1 OS=Rattus norvegicus GN=Sh3glb1 PE=2 SV=1 - [SHLB1_RAT]	2,09
<b>Q5FVQ8</b>	NLR family member X1 OS=Rattus norvegicus GN=NlrX1 PE=2 SV=1 - [NLRX1_RAT]	2,08
<b>Q9JI92</b>	Syntenin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Sdcbp PE=1 SV=1 - [SDCB1_RAT]	2,08
<b>Q6U6G5</b>	Zinc finger CCCH domain-containing protein 15 OS=Rattus norvegicus GN=Zc3h15 PE=2 SV=1 - [ZC3HF_RAT]	2,08
<b>P24329</b>	Thiosulfate sulfurtransferase OS=Rattus norvegicus GN=Tst PE=1 SV=3 - [THTR_RAT]	2,07
<b>P47875</b>	Cysteine and glycine-rich protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Csrp1 PE=2 SV=2 - [CSRP1_RAT]	2,06
<b>Q63617</b>	Hypoxia up-regulated protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Hyou1 PE=1 SV=1 - [HYOU1_RAT]	2,05
<b>Q9EQP5</b>	Prolargin OS=Rattus norvegicus GN=Prelp PE=2 SV=1 - [PRELP_RAT]	2,05
<b>Q9QY17</b>	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2 protein OS=Rattus norvegicus GN=Pacsin2 PE=1 SV=2 - [PACN2_RAT]	2,04
<b>P34067</b>	Proteasome subunit beta type-4 OS=Rattus norvegicus GN=Psm4 PE=1 SV=2 - [PSB4_RAT]	2,04
<b>Q9ERZ8</b>	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 OS=Rattus norvegicus GN=Trpv4 PE=1 SV=1 - [TRPV4_RAT]	2,03

<b>P18484</b>	AP-2 complex subunit alpha-2 OS=Rattus norvegicus GN=Ap2a2 PE=1 SV=3 - [AP2A2_RAT]	2,03
<b>P80385</b>	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-1 OS=Rattus norvegicus GN=Prkag1 PE=1 SV=3 - [AAKG1_RAT]	2,02
<b>O54861</b>	Sortilin OS=Rattus norvegicus GN=Sort1 PE=1 SV=3 - [SORT_RAT]	2,01
<b>Q9JHB5</b>	Translin-associated protein X OS=Rattus norvegicus GN=Tsnax PE=1 SV=1 - [TSNAX_RAT]	2,01
<b>P23711</b>	Heme oxygenase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Hmox2 PE=1 SV=1 - [HMOX2_RAT]	2,01
<b>P01946</b>	Hemoglobin subunit alpha-1/2 OS=Rattus norvegicus GN=Hba1 PE=1 SV=3 - [HBA_RAT]	2,00

**Πίνακας Παραρτήματος 10:** Διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση στα SHR ζώα 20 εβδομάδων όπως προέκυψε από την ανάλυση του νεφρικού παρεγχύματος με LC-MS/MS. Το στατιστικό τεστ Mann-Whitney χρησιμοποιήθηκε. Όλες οι τιμές είναι στατιστικά σημαντικές με  $p < 0.05$

Κωδικός	Πρωτεΐνη	Λόγος Έκφρασης (SHR/WKY)
<b>P62755</b>	40S ribosomal protein S6 OS=Rattus norvegicus GN=Rps6 PE=1 SV=1 - [RS6_RAT]	0,50
<b>Q6IRI9</b>	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 2 OS=Rattus norvegicus GN=Fmo2 PE=2 SV=3 - [FMO2_RAT]	0,50
<b>P12928</b>	Pyruvate kinase PKLR OS=Rattus norvegicus GN=Pklr PE=2 SV=2 - [KPYR_RAT]	0,50
<b>Q9QWN8</b>	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2 OS=Rattus norvegicus GN=Sptbn2 PE=1 SV=2 - [SPTN2_RAT]	0,50
<b>Q4FZY0</b>	EF-hand domain-containing protein D2 OS=Rattus norvegicus GN=Efh2 PE=1 SV=1 - [EFHD2_RAT]	0,50
<b>Q5RKI8</b>	ATP-binding cassette sub-family B member 8, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Abcb8 PE=2 SV=1 - [ABCB8_RAT]	0,49
<b>Q9ERR2</b>	COMM domain-containing protein 5 OS=Rattus norvegicus GN=Commd5 PE=2 SV=1 - [COMD5_RAT]	0,49
<b>P70615</b>	Lamin-B1 OS=Rattus norvegicus GN=Lmnb1 PE=1 SV=3 - [LMNB1_RAT]	0,49
<b>Q562C6</b>	Leucine zipper transcription factor-like protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Lztl1 PE=2 SV=1 - [LZTL1_RAT]	0,49
<b>Q66HG6</b>	Carbonic anhydrase 5B, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ca5b PE=2 SV=1 - [CAH5B_RAT]	0,49
<b>Q5FVJ0</b>	Protein RUFY3 OS=Rattus norvegicus GN=Rufy3 PE=1 SV=1 - [RUFY3_RAT]	0,49
<b>B2GUV7</b>	Eukaryotic translation initiation factor 5B OS=Rattus norvegicus GN=Eif5b PE=1 SV=1 - [IF2P_RAT]	0,49
<b>P70580</b>	Membrane-associated progesterone receptor component 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgrmc1 PE=1 SV=3 - [PGRC1_RAT]	0,48
<b>Q99N37</b>	Rho GTPase-activating protein 17 OS=Rattus norvegicus GN=Arhgap17 PE=1 SV=1 - [RHG17_RAT]	0,48
<b>Q04462</b>	Valine--tRNA ligase OS=Rattus norvegicus GN=Vars PE=2 SV=2 - [SYVC_RAT]	0,48
<b>P52296</b>	Importin subunit beta-1 OS=Rattus norvegicus GN=Kpnb1 PE=1 SV=1 - [IMB1_RAT]	0,48
<b>P43427</b>	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5 OS=Rattus norvegicus GN=Slc2a5 PE=2 SV=1 - [GTR5_RAT]	0,48

<b>P07323</b>	Gamma-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno2 PE=1 SV=2 - [ENOG_RAT]	0,48
<b>Q63083</b>	Nucleobindin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Nucb1 PE=1 SV=1 - [NUCB1_RAT]	0,48
<b>Q9R0T4</b>	Cadherin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Cdh1 PE=1 SV=1 - [CADH1_RAT]	0,47
<b>P08683</b>	Cytochrome P450 2C11 OS=Rattus norvegicus GN=Cyp2c11 PE=1 SV=1 - [CP2CB_RAT]	0,47
<b>B4F766</b>	Dymeclin OS=Rattus norvegicus GN=Dym PE=2 SV=1 - [DYM_RAT]	0,47
<b>Q5XIB4</b>	Ufm1-specific protease 2 OS=Rattus norvegicus GN=Ufsp2 PE=2 SV=1 - [UFSP2_RAT]	0,47
<b>O35567</b>	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH OS=Rattus norvegicus GN=Atic PE=1 SV=2 - [PUR9_RAT]	0,47
<b>P30713</b>	Glutathione S-transferase theta-2 OS=Rattus norvegicus GN=Gstt2 PE=1 SV=3 - [GSTT2_RAT]	0,47
<b>Q03626</b>	Murinoglobulin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Mug1 PE=2 SV=1 - [MUG1_RAT]	0,46
<b>P81799</b>	N-acetyl-D-glucosamine kinase OS=Rattus norvegicus GN=Nagk PE=1 SV=4 - [NAGK_RAT]	0,46
<b>P25286</b>	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1 OS=Rattus norvegicus GN=Atp6v0a1 PE=2 SV=1 - [VPP1_RAT]	0,46
<b>P14046</b>	Alpha-1-inhibitor 3 OS=Rattus norvegicus GN=Al13 PE=1 SV=1 - [A1I3_RAT]	0,46
<b>P62716</b>	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform OS=Rattus norvegicus GN=Ppp2cb PE=2 SV=1 - [PP2AB_RAT]	0,46
<b>O35956</b>	Solute carrier family 22 member 6 OS=Rattus norvegicus GN=Slc22a6 PE=1 SV=1 - [S22A6_RAT]	0,46
<b>Q9Z1Y3</b>	Cadherin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Cdh2 PE=1 SV=1 - [CADH2_RAT]	0,46
<b>Q5FVF9</b>	Biotinidase OS=Rattus norvegicus GN=Btd PE=2 SV=1 - [BTD_RAT]	0,44
<b>P09456</b>	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit OS=Rattus norvegicus GN=Prkar1a PE=1 SV=2 - [KAP0_RAT]	0,44
<b>P04916</b>	Retinol-binding protein 4 OS=Rattus norvegicus GN=Rbp4 PE=1 SV=1 - [RET4_RAT]	0,44
<b>Q5M9G9</b>	Protein TBRG4 OS=Rattus norvegicus GN=Tbrg4 PE=2 SV=1 - [TBRG4_RAT]	0,44
<b>P51583</b>	Multifunctional protein ADE2 OS=Rattus norvegicus GN=Paics PE=2 SV=3 - [PUR6_RAT]	0,44
<b>P69060</b>	N-acylneuraminate cytidyltransferase OS=Rattus norvegicus GN=Cmas PE=2 SV=1 - [NEUA_RAT]	0,43
<b>Q6PCU8</b>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ndufv3 PE=3 SV=1 - [NDUV3_RAT]	0,43
<b>Q8CHN6</b>	Sphingosine-1-phosphate lyase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Sgpl1 PE=2 SV=1 - [SGPL1_RAT]	0,43

<b>Q9ES40</b>	PRA1 family protein 3 OS=Rattus norvegicus GN=Arl6ip5 PE=1 SV=1 - [PRAF3_RAT]	0,42
<b>Q64537</b>	Calpain small subunit 1 OS=Rattus norvegicus GN=Capns1 PE=1 SV=3 - [CPNS1_RAT]	0,42
<b>Q07205</b>	Eukaryotic translation initiation factor 5 OS=Rattus norvegicus GN=Eif5 PE=1 SV=1 - [IF5_RAT]	0,42
<b>P49793</b>	Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96 OS=Rattus norvegicus GN=Nup98 PE=1 SV=2 - [NUP98_RAT]	0,42
<b>P53042</b>	Serine/threonine-protein phosphatase 5 OS=Rattus norvegicus GN=Ppp5c PE=1 SV=1 - [PPP5_RAT]	0,42
<b>Q498R7</b>	UPF0587 protein C1orf123 homolog OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=1 - [CA123_RAT]	0,42
<b>Q8R431</b>	Monoglyceride lipase OS=Rattus norvegicus GN=Mgll PE=1 SV=1 - [MGLL_RAT]	0,42
<b>P62775</b>	Myotrophin OS=Rattus norvegicus GN=Mtpn PE=1 SV=2 - [MTPN_RAT]	0,41
<b>Q9QYF3</b>	Unconventional myosin-Va OS=Rattus norvegicus GN=Myo5a PE=1 SV=1 - [MYO5A_RAT]	0,41
<b>P21571</b>	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5j PE=1 SV=1 - [ATP5J_RAT]	0,41
<b>P84100</b>	60S ribosomal protein L19 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl19 PE=1 SV=1 - [RL19_RAT]	0,41
<b>P54319</b>	Phospholipase A-2-activating protein OS=Rattus norvegicus GN=Plaa PE=2 SV=3 - [PLAP_RAT]	0,41
<b>Q6UPR8</b>	Endoplasmic reticulum metalloproteinase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Ermp1 PE=1 SV=1 - [ERMP1_RAT]	0,41
<b>P62250</b>	40S ribosomal protein S16 OS=Rattus norvegicus GN=Rps16 PE=1 SV=2 - [RS16_RAT]	0,41
<b>Q561R9</b>	Beta-lactamase-like protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Lactb2 PE=2 SV=1 - [LACB2_RAT]	0,41
<b>Q6P7S1</b>	Acid ceramidase OS=Rattus norvegicus GN=Asah1 PE=2 SV=1 - [ASAH1_RAT]	0,40
<b>Q63424</b>	Solute carrier family 15 member 2 OS=Rattus norvegicus GN=Slc15a2 PE=2 SV=1 - [S15A2_RAT]	0,40
<b>P62271</b>	40S ribosomal protein S18 OS=Rattus norvegicus GN=Rps18 PE=1 SV=3 - [RS18_RAT]	0,40
<b>Q62785</b>	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein OS=Rattus norvegicus GN=Pdap1 PE=1 SV=1 - [HAP28_RAT]	0,40
<b>F1LRS8</b>	CD2-associated protein OS=Rattus norvegicus GN=Cd2ap PE=1 SV=2 - [CD2AP_RAT]	0,40
<b>Q923V4</b>	F-box only protein 6 OS=Rattus norvegicus GN=Fbxo6 PE=2 SV=1 - [FBX6_RAT]	0,40
<b>Q6AXX6</b>	Redox-regulatory protein FAM213A OS=Rattus norvegicus GN=Fam213a PE=1 SV=1 - [F213A_RAT]	0,40
<b>Q5RK27</b>	Solute carrier family 12 member 7 OS=Rattus norvegicus GN=Slc12a7 PE=2 SV=2 - [S12A7_RAT]	0,39
<b>Q01984</b>	Histamine N-methyltransferase OS=Rattus norvegicus GN=Hnmt PE=1 SV=3 - [HNMT_RAT]	0,39

<b>Q4G061</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B OS=Rattus norvegicus GN=Eif3b PE=1 SV=1 - [EIF3B_RAT]	0,39
<b>Q6AY63</b>	ADP-sugar pyrophosphatase OS=Rattus norvegicus GN=Nudt5 PE=2 SV=1 - [NUDT5_RAT]	0,39
<b>P05943</b>	Protein S100-A10 OS=Rattus norvegicus GN=S100a10 PE=1 SV=2 - [S10AA_RAT]	0,38
<b>Q99M63</b>	WD40 repeat-containing protein SMU1 OS=Rattus norvegicus GN=Smu1 PE=2 SV=1 - [SMU1_RAT]	0,38
<b>P50430</b>	Arylsulfatase B OS=Rattus norvegicus GN=Arsb PE=2 SV=2 - [ARSB_RAT]	0,38
<b>Q4KM74</b>	Vesicle-trafficking protein SEC22b OS=Rattus norvegicus GN=Sec22b PE=1 SV=3 - [SC22B_RAT]	0,38
<b>Q8VID1</b>	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4 OS=Rattus norvegicus GN=Dhrs4 PE=2 SV=2 - [DHRS4_RAT]	0,37
<b>P20759</b>	Ig gamma-1 chain C region OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=1 - [IGHG1_RAT]	0,37
<b>P21263</b>	Nestin OS=Rattus norvegicus GN=Nes PE=1 SV=2 - [NEST_RAT]	0,37
<b>Q7TNY6</b>	Golgi resident protein GCP60 OS=Rattus norvegicus GN=Acbd3 PE=2 SV=3 - [GCP60_RAT]	0,36
<b>Q99PF5</b>	Far upstream element-binding protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Khsrp PE=1 SV=1 - [FUBP2_RAT]	0,36
<b>Q9QXU2</b>	Surfeit locus protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Surf1 PE=2 SV=1 - [SURF1_RAT]	0,36
<b>Q5PPN7</b>	Coiled-coil domain-containing protein 51 OS=Rattus norvegicus GN=Ccdc51 PE=2 SV=2 - [CCD51_RAT]	0,35
<b>P20767</b>	Ig lambda-2 chain C region OS=Rattus norvegicus PE=4 SV=1 - [LAC2_RAT]	0,35
<b>O35795</b>	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Entpd2 PE=1 SV=1 - [ENTP2_RAT]	0,34
<b>Q08850</b>	Syntaxin-4 OS=Rattus norvegicus GN=Stx4 PE=1 SV=1 - [STX4_RAT]	0,33
<b>Q6DGG1</b>	Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B OS=Rattus norvegicus GN=Abhd14b PE=2 SV=1 - [ABHEB_RAT]	0,33
<b>P04905</b>	Glutathione S-transferase Mu 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm1 PE=1 SV=2 - [GSTM1_RAT]	0,33
<b>Q9QXT3</b>	N-acetyltransferase 8 OS=Rattus norvegicus GN=Nat8 PE=1 SV=1 - [NAT8_RAT]	0,33
<b>Q91XU8</b>	Phosphatidate cytidyltransferase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Cds2 PE=2 SV=1 - [CDS2_RAT]	0,32
<b>P86172</b>	NmrA-like family domain-containing protein 1 (Fragments) OS=Rattus norvegicus GN=Nmral1 PE=1 SV=1 - [NMRL1_RAT]	0,31
<b>Q925S8</b>	ATP-dependent zinc metalloprotease YME1L1 OS=Rattus norvegicus GN=Yme1l1 PE=2 SV=1 - [YMEL1_RAT]	0,31



<b>P04638</b>	Apolipoprotein A-II OS=Rattus norvegicus GN=Apoa2 PE=2 SV=1 - [APOA2_RAT]	0,31
<b>Q5XIE0</b>	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E OS=Rattus norvegicus GN=Anp32e PE=2 SV=1 - [AN32E_RAT]	0,31
<b>P05539</b>	Collagen alpha-1(II) chain OS=Rattus norvegicus GN=Col2a1 PE=1 SV=2 - [CO2A1_RAT]	0,30
<b>Q9Z1M9</b>	Structural maintenance of chromosomes protein 1A OS=Rattus norvegicus GN=Smc1a PE=1 SV=1 - [SMC1A_RAT]	0,30
<b>D4AAT7</b>	ATP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase OS=Rattus norvegicus GN=Carkd PE=3 SV=1 - [NNRD_RAT]	0,30
<b>Q78P75</b>	Dynein light chain 2, cytoplasmic OS=Rattus norvegicus GN=Dynll2 PE=1 SV=1 - [DYL2_RAT]	0,29
<b>P28494</b>	Alpha-mannosidase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Man2a1 PE=1 SV=2 - [MA2A1_RAT]	0,29
<b>P97834</b>	COP9 signalosome complex subunit 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gps1 PE=1 SV=1 - [CSN1_RAT]	0,29
<b>P02767</b>	Transthyretin OS=Rattus norvegicus GN=Ttr PE=1 SV=1 - [TTHY_RAT]	0,28
<b>Q924K2</b>	FAS-associated factor 1 OS=Rattus norvegicus GN=Faf1 PE=2 SV=1 - [FAF1_RAT]	0,28
<b>P97878</b>	Exocyst complex component 5 OS=Rattus norvegicus GN=Exoc5 PE=1 SV=1 - [EXOC5_RAT]	0,28
<b>P62890</b>	60S ribosomal protein L30 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl30 PE=3 SV=2 - [RL30_RAT]	0,27
<b>Q32PZ3</b>	Protein unc-45 homolog A OS=Rattus norvegicus GN=Unc45a PE=2 SV=1 - [UN45A_RAT]	0,27
<b>F1MA98</b>	Nucleoprotein TPR OS=Rattus norvegicus GN=Tpr PE=1 SV=1 - [TPR_RAT]	0,26
<b>Q6P7R8</b>	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase OS=Rattus norvegicus GN=Hsd17b12 PE=2 SV=1 - [DHB12_RAT]	0,24
<b>P81718</b>	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 OS=Rattus norvegicus GN=Ptpn6 PE=1 SV=1 - [PTN6_RAT]	0,24
<b>Q3KR59</b>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10 OS=Rattus norvegicus GN=Usp10 PE=2 SV=1 - [UBP10_RAT]	0,24
<b>Q99376</b>	Transferrin receptor protein 1 (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Tfrc PE=2 SV=1 - [TFR1_RAT]	0,23
<b>D3ZHV2</b>	Microtubule-actin cross-linking factor 1 OS=Rattus norvegicus GN=Macf1 PE=1 SV=1 - [MACF1_RAT]	0,22
<b>Q6AXS3</b>	Protein DEK OS=Rattus norvegicus GN=Dek PE=2 SV=1 - [DEK_RAT]	0,22
<b>P07154</b>	Cathepsin L1 OS=Rattus norvegicus GN=Ctsl PE=1 SV=2 - [CATL1_RAT]	0,22
<b>Q5XI79</b>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] complex I, assembly factor 7 OS=Rattus norvegicus GN=Ndufaf7 PE=2 SV=1 - [NDUF7_RAT]	0,21

<b>Q5HZA9</b>	Transmembrane protein 126A OS=Rattus norvegicus GN=Tmem126a PE=2 SV=1 - [T126A_RAT]	0,21
<b>P34901</b>	Syndecan-4 OS=Rattus norvegicus GN=Sdc4 PE=1 SV=1 - [SDC4_RAT]	0,19
<b>Q5BKD0</b>	Inactive 2'-5'-oligoadenylate synthase 1B OS=Rattus norvegicus GN=Oas1b PE=2 SV=1 - [OAS1B_RAT]	0,19
<b>P17046</b>	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Lamp2 PE=1 SV=2 - [LAMP2_RAT]	0,19
<b>P10686</b>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-1 OS=Rattus norvegicus GN=Plcg1 PE=1 SV=1 - [PLCG1_RAT]	0,16
<b>O35179</b>	Endophilin-A1 OS=Rattus norvegicus GN=Sh3gl2 PE=1 SV=2 - [SH3G2_RAT]	0,12
<b>P16303</b>	Carboxylesterase 1D OS=Rattus norvegicus GN=Ces1d PE=1 SV=2 - [CES1D_RAT]	0,12
<b>B5DFN3</b>	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 2 OS=Rattus norvegicus GN=Uqcc2 PE=2 SV=1 - [UQCC2_RAT]	0,11
<b>Q62991</b>	Sec1 family domain-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Scfd1 PE=1 SV=1 - [SCFD1_RAT]	0,08
<b>P85845</b>	Fascin OS=Rattus norvegicus GN=Fscn1 PE=1 SV=2 - [FSCN1_RAT]	0,07
<b>P31646</b>	Sodium- and chloride-dependent GABA transporter 2 OS=Rattus norvegicus GN=Slc6a13 PE=1 SV=1 - [S6A13_RAT]	0,002

**Πίνακας Παραρτήματος 11:** Διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στα SHR ζώα όπως προέκυψε από την ανάλυση του πρωτεόματος των νεφρικών αγγείων με LC-MS/MS. Το στατιστικό τεστ Mann-Whitney χρησιμοποιήθηκε. Όλες οι τιμές είναι στατιστικά σημαντικές με  $p < 0.05$

Γονίδιο	Κωδικός	Πρωτεΐνη	Λόγος Έκφρασης (SHR/WKY)
<b>Cfl1</b>	P45592	Cofilin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Cfl1 PE=1 SV=3 - [COF1_RAT]	1,61
<b>Lpp</b>	Q5XI07	Lipoma-preferred partner homolog OS=Rattus norvegicus GN=Lpp PE=2 SV=1 - [LPP_RAT]	1,61
<b>Mvp</b>	Q62667	Major vault protein OS=Rattus norvegicus GN=Mvp PE=1 SV=4 - [MVP_RAT]	1,61
<b>Myl6</b>	Q64119	Myosin light polypeptide 6 OS=Rattus norvegicus GN=Myl6 PE=1 SV=3 - [MYL6_RAT]	1,62
<b>Myl3</b>	P16409	Myosin light chain 3 OS=Rattus norvegicus GN=Myl3 PE=2 SV=2 - [MYL3_RAT]	1,64
<b>Alb</b>	P02770	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2 - [ALBU_RAT]	1,73
<b>Ddah1</b>	O08557	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Ddah1 PE=1 SV=3 - [DDAH1_RAT]	1,77
<b>Sorbs2</b>	O35413	Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Sorbs2 PE=1 SV=2 - [SRBS2_RAT]	1,81
<b>Agmat</b>	Q0D2L3	Agmatinase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Agmat PE=2 SV=1 - [SPEB_RAT]	1,86
<b>Csrp1</b>	P47875	Cysteine and glycine-rich protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Csrp1 PE=2 SV=2 - [CSR1_RAT]	2,11
<b>Ak2</b>	P29410	Adenylate kinase 2, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ak2 PE=2 SV=2 - [KAD2_RAT]	2,27
<b>Hpx</b>	P20059	Hemopexin OS=Rattus norvegicus GN=Hpx PE=1 SV=3 - [HEMO_RAT]	2,70
<b>Qdpr</b>	P11348	Dihydropteridine reductase OS=Rattus norvegicus GN=Qdpr PE=1 SV=1 - [DHPR_RAT]	3,05
<b>Pecr</b>	Q9WVK3	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase OS=Rattus norvegicus GN=Pecr PE=2 SV=1 - [PECR_RAT]	3,62
<b>Ca1</b>	B0BNN3	Carbonic anhydrase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Ca1 PE=1 SV=1 - [CAH1_RAT]	7,26

**Πίνακας Παραρτήματος 12:** Διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση στα SHR ζώα όπως προέκυψε από την ανάλυση του πρωτεόματος των νεφρικών αγγείων με LC-MS/MS. Το στατιστικό τεστ Mann-Whitney χρησιμοποιήθηκε. Όλες οι τιμές είναι στατιστικά σημαντικές με  $p < 0.05$

Γονίδιο	Κωδικός	Πρωτεΐνη	Λόγος Έκφρασης (SHR/WKY)
<b>Atp1a1</b>	P06685	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Rattus norvegicus GN=Atp1a1 PE=1 SV=1 - [AT1A1_RAT]	0,10
<b>Phb</b>	P67779	Prohibitin OS=Rattus norvegicus GN=Phb PE=1 SV=1 - [PHB_RAT]	0,25
<b>Atp1b1</b>	P07340	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1 OS=Rattus norvegicus GN=Atp1b1 PE=1 SV=1 - [AT1B1_RAT]	0,27
<b>Atp5f1</b>	P19511	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5f1 PE=1 SV=1 - [AT5F1_RAT]	0,29
<b>Atp5o</b>	Q06647	ATP synthase subunit O, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5o PE=1 SV=1 - [ATPO_RAT]	0,36
<b>Atp5c1</b>	P35435	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5c1 PE=1 SV=2 - [ATPG_RAT]	0,36
<b>Atp5h</b>	P31399	ATP synthase subunit d, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5h PE=1 SV=3 - [ATP5H_RAT]	0,36
<b>Anpep</b>	P15684	Aminopeptidase N OS=Rattus norvegicus GN=Anpep PE=1 SV=2 - [AMPN_RAT]	0,37
<b>Slc25a4</b>	Q05962	ADP/ATP translocase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Slc25a4 PE=1 SV=3 - [ADT1_RAT]	0,39
<b>Ndufa11</b>	Q80W89	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11 OS=Rattus norvegicus GN=Ndufa11 PE=2 SV=1 - [NDUAB_RAT]	0,40
<b>Slc25a5</b>	Q09073	ADP/ATP translocase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Slc25a5 PE=1 SV=3 - [ADT2_RAT]	0,41
<b>Apmap</b>	Q7TP48	Adipocyte plasma membrane-associated protein OS=Rattus norvegicus GN=Apmap PE=2 SV=2 - [APMAP_RAT]	0,42
<b>Atp5a1</b>	P15999	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5a1 PE=1 SV=2 - [ATPA_RAT]	0,42
<b>Phb2</b>	Q5XIH7	Prohibitin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Phb2 PE=1 SV=1 - [PHB2_RAT]	0,43
<b>Serpina3k</b>	P05545	Serine protease inhibitor A3K OS=Rattus norvegicus GN=Serpina3k PE=1 SV=3 - [SPA3K_RAT]	0,43
<b>Cltc</b>	P11442	Clathrin heavy chain 1 OS=Rattus norvegicus GN=Cltc PE=1 SV=3 - [CLH1_RAT]	0,44

<b>Calb1</b>	P07171	Calbindin OS=Rattus norvegicus GN=Calb1 PE=1 SV=2 - [CALB1_RAT]	0,46
<b>Tmem27</b>	Q9ESG3	Collectrin OS=Rattus norvegicus GN=Tmem27 PE=1 SV=2 - [TMM27_RAT]	0,46
<b>Hist1h2ba</b>	Q00729	Histone H2B type 1-A OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h2ba PE=1 SV=2 - [H2B1A_RAT]	0,49
<b>Vdac1</b>	Q9Z2L0	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Vdac1 PE=1 SV=4 - [VDAC1_RAT]	0,49
<b>Pyroxd2</b>	Q68FT3	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase domain-containing protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Pyroxd2 PE=2 SV=1 - [PYRD2_RAT]	0,51
<b>Atp5b</b>	P10719	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=1 SV=2 - [ATPB_RAT]	0,51
<b>Uba1</b>	Q5U300	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Rattus norvegicus GN=Uba1 PE=1 SV=1 - [UBA1_RAT]	0,52
<b>Pdha1</b>	P26284	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Pdha1 PE=1 SV=2 - [ODPA_RAT]	0,52
<b>Hnrnpk</b>	P61980	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpk PE=1 SV=1 - [HNRPK_RAT]	0,53
<b>Ndufs1</b>	Q66HF1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ndufs1 PE=1 SV=1 - [NDUS1_RAT]	0,53
<b>Enpep</b>	P50123	Glutamyl aminopeptidase OS=Rattus norvegicus GN=Enpep PE=1 SV=2 - [AMPE_RAT]	0,53
<b>Ubb</b>	P0CG51	Polyubiquitin-B OS=Rattus norvegicus GN=Ubb PE=1 SV=1 - [UBB_RAT]	0,54
<b>Ubc</b>	P62982	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Rattus norvegicus GN=Rps27a PE=1 SV=2 - [RS27A_RAT]	0,54
<b>Rps27a</b>	P62986	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 OS=Rattus norvegicus GN=Uba52 PE=1 SV=2 - [RL40_RAT]	0,54
<b>Uba52</b>	Q63429	Polyubiquitin-C OS=Rattus norvegicus GN=Ubc PE=1 SV=1 - [UBC_RAT]	0,54
	Q00715	Histone H2B type 1 OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2 - [H2B1_RAT]	0,55
<b>Calb2</b>	P47728	Calretinin OS=Rattus norvegicus GN=Calb2 PE=1 SV=1 - [CALB2_RAT]	0,55
<b>Rpl31</b>	P62902	60S ribosomal protein L31 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl31 PE=2 SV=1 - [RL31_RAT]	0,56
<b>Ivd</b>	P12007	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ivd PE=1 SV=2 - [IVD_RAT]	0,56
<b>Rpl30</b>	P62890	60S ribosomal protein L30 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl30 PE=3 SV=2 - [RL30_RAT]	0,57
<b>Hsd17b4</b>	P97852	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 OS=Rattus norvegicus GN=Hsd17b4 PE=1 SV=3 -	0,59

		[DHB4_RAT]	
<b>Tmed10</b>	Q63584	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 OS=Rattus norvegicus GN=Tmed10 PE=1 SV=2 - [TMEDA_RAT]	0,60
<b>Rab11b</b>	O35509	Ras-related protein Rab-11B OS=Rattus norvegicus GN=Rab11b PE=1 SV=4 - [RB11B_RAT]	0,61
<b>Pah</b>	P04176	Phenylalanine-4-hydroxylase OS=Rattus norvegicus GN=Pah PE=1 SV=3 - [PH4H_RAT]	0,62
<b>Sptan1</b>	P16086	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Sptan1 PE=1 SV=2 - [SPTN1_RAT]	0,64
<b>Xpnpep1</b>	O54975	Xaa-Pro aminopeptidase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Xpnpep1 PE=1 SV=1 - [XPP1_RAT]	0,65
<b>Hnrnpd</b>	Q9JJ54	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpd PE=1 SV=1 - [HNRPD_RAT]	0,66