

Πρωτεϊνωματική ανάλυση για την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των μουκινών από προκλητά πτύελα ασθενών με σοβαρό άσθμα: μια πιλοτική μελέτη

Δ.Ιωαννίδου^{1,2}, Κ.Γεωργούλα^{3,4}, Χ.Ντέντη², Κ.Πορπόδης⁵, Κ.Ψαθά^{3,4,6}, Σ.Μανιάτση^{3,4}, Μ. Σαμιωτάκη⁷, Χ. Κοτσόπουλος^{3,4}, Δ.Παπακώστα⁵, Α.Γούλας^{2,8}, Μ.Αιβαλιώτης^{3,4,9}

¹Πνευμονολογική κλινική, Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης, ²Α' Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ³Λειτουργική Πρωτεϊνωματική Ανάλυση και Βιολογία Συστημάτων (FunPATH) - Κέντρο Διεπιστημονικής Έρευνας και Καινοτομίας (ΚΕΔΕΚ-ΑΠΘ), Θεσσαλονίκη, ⁴Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τομέας Βιολογικών Επιστημών και Προληπτικής Ιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ⁵Πνευμονολογική Κλινική ΑΠΘ, ΓΝΘ Γ.ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ, ⁶Εργαστήριο Ιατρικής Βιολογίας-Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, ΑΠΘ, ⁷Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΓΚ", Αθήνα, ⁸Μονάδα Κλινικής Έρευνας, Ειδική Μονάδα Βιοϊατρικής Έρευνας και Εκπαίδευσης, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ⁹Μονάδα Βασικής και Μεταφραστικής Έρευνας, Ειδική Μονάδα Βιοϊατρικής Έρευνας και Εκπαίδευσης, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Εισαγωγή

Οι μουκίνες είναι **πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους** που αποτελούν βασικό συστατικό της βλέννης των αεραγωγών.

Οι μουκίνες **MUC5AC** και **MUC5B** συμβάλλουν στη βλεννοκροσώτη κάθαρση και την **άμυνα του επιθηλίου**.

Στο **βρογχικό άσθμα**, παρατηρείται **μεταβολή στην αναλογία** τους, συμβάλλοντας στην **απόφραξη των αεραγωγών** και στις **παροξύνσεις** της νόσου.

Η μελέτη των μουκινών παρουσιάζει προκλήσεις, λόγω της ετερογενούς και σύνθετης δομής τους και των τεχνικών δυσκολιών ανάλυσής τους, περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο τη περαιτέρω συσχέτιση τους με κλινικούς φαινοτύπους.

Μεθοδολογία

1. Συλλογή προκλητών πτυέλων από τους ασθενείς με σοβαρό άσθμα (N=4)

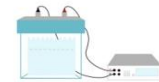
2. Λύση & διαλυτοποίηση δειγμάτων

Διαλύματα λύσης: Urea/Guanidine; Ripa/Tris/SDS; Tris/SDS; Ripa

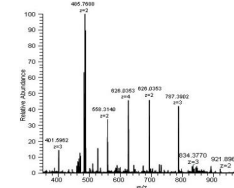
3α. Προετοιμασία δειγμάτων με τη βοήθεια φίλτρου (FASP)



3β. Αποδιατακτικός διαχωρισμός πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση



4α. Φασματομετρία μάζας



4β. Western blotting



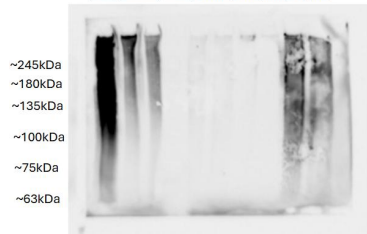
5α. Βιοπληροφορική ανάλυση



Αποτελέσματα

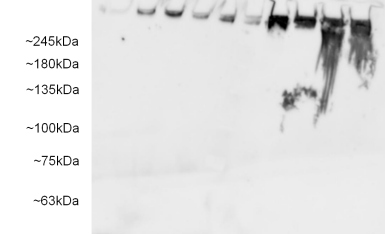
A. Ανοσοαποτύπωση των MUC5AC & MUC5B

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 µg of protein 14,4 17,52 1,68 6,48 2,16 15,84 3,6
 R/T/S U/Gn1 M U/Gn2 RIPA1 RIPA2 T/S R/T/S



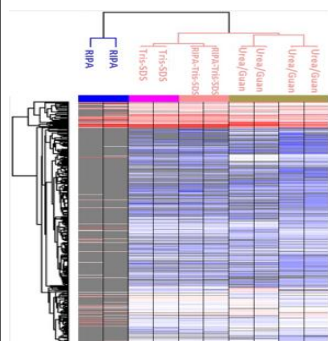
MUC5AC

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 µg of protein 17,52 1,68 6,48 2,16 15,84 3,6
 S.B. U/Gn1 U/Gn2 M RIPA1 RIPA2 T/S R/T/S

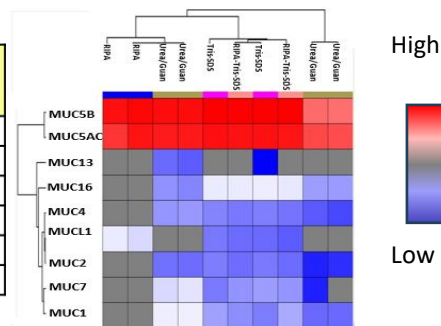


MUC5B

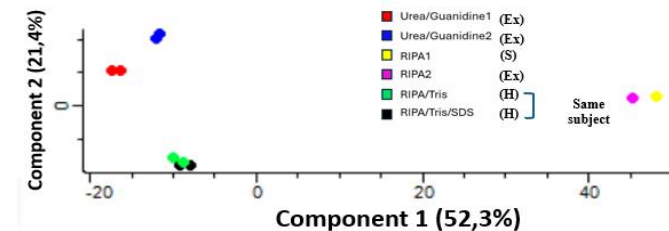
B. Συγκριτική πρωτεϊνωματική ανάλυση με Φασματομετρία μάζας



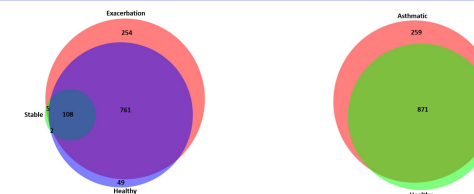
Sample	Total number of proteins identified
U/Gn1	993
U/Gn2	878
RIPA1	115
RIPA2	134
T/SDS	825
R/T/SDS	804



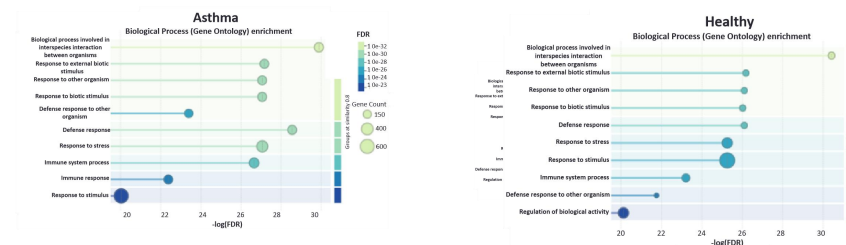
C. Σύγκριση του πρωτεϊνικού προφίλ των δειγμάτων πτυέλου με PCA ανάλυση



D. Σύγκριση της κατανομής των πρωτεϊνών ανά βιολογική κατάσταση [BioVenn]



E. Λειτουργική ανάλυση εμπλουτισμού ανά κλινική κατάσταση με τη χρήση του λογισμικού STRING



Ανάλυση ποσοστού κάλυψης των πρωτεϊνών από δεδομένα φασματομετρίας μάζας

Mucin	MUC1	MUCL1	MUC2	MUC4	MUC5B	MUC5AC	MUC7	MUC13	MUC16
Total protein length	1255	90	5289	5412	5762	5654	377	512	14507
Coverage residues	54	90	105	142	931	1895	45	27	198
Coverage	4,30%	13,33%	1,99%	2,62%	16,16%	33,52%	11,94%	5,27%	1,36%

Συμπεράσματα

- Η πρωτεϊνωματική ανάλυση επέτρεψε την ταυτοποίηση ~1000 πρωτεϊνών, εκ των οποίων οι εννέα ήταν μουκίνες
- Οι μουκίνες MUC5AC και MUC5B ταυτοποιήθηκαν σε υψηλή αφθονία σε όλα τα δείγματα (σε όλα τα διαλύματα λύσης)
- Η μελέτη παρουσιάζει ένα βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο ανάλυσης μουκινών σε δείγματα προκλητών πτυέλων
- Μελλοντική εφαρμογή του πρωτοκόλλου σε περισσότερα δείγματα, θα προωθήσει την έρευνα σε βλεννο-αποφρακτικές παθήσεις, ταυτοποιώντας πιθανούς βιοδείκτες για αποφρακτικά νοσήματα, όπως το άσθμα και η ΧΑΠ