Abstrakt

Kardiovaskulární onemocnění představují nejvyšší zdroj mortality i morbidity v Evropě. Více než 4 miliony lidí ročně na tato onemocnění zemře a více než 11 milionů nových případů kardiovaskulárních onemocnění se objeví každý rok. Tato čísla jen poukazují na to, že je zde potřeba nejen pro lepší diagnostické, prognostické a prediktivní biomarkery, ale také potřeba pro nové a efektivnější léky. Integrální membránové proteiny (IMP) jsou ideálními kandidáty na nové cíle léčiv.

Analýza IMP stále představuje jeden z hlavních problémů současné proteomiky. Důvodem je nízká úroveň exprese IMP, jejich snížená rozpustnost ve vodě a také nedostatek trypsinových štěpných míst v transmembránových segmentech. Byla vyvinuta celá řada metod, které se snaží tyto problémy obejít. Jedná se zejména o metody, které selektivně cílí na N-glykosylované segmenty IMP (CSC, SPEG, N-glyco-FASP), a nebo metody, které naopak cílí na hydrofobní transmembránové segmenty (hpTC). My jsme se v této práci rozhodli spojit dva přístupy, které cílí na N-glykosylované extramembránové segmenty IMP (SPEG a N-glyco-FASP) provedené na dvou typech vzorku (na celotkáňovém lyzátu a membránové frakci) spolu s hpTC metodou, která naopak cílí na hydrofobní transmembránové segmenty a s necíleným „detergent+trypsin“ přístupem. Tento kombinovaný přístup byl využit k analýze membránového proteomu potkaního myokardu. Dále bylo provedeno srovnání dvou metod přípravy membránové frakce pomocí western blotové analýzy zvolených membránových a cytosolických proteinů.

S využitím tohoto kombinovaného přístupu jsme identifikovali přes 1000 membránových proteinů v potkaním myokardiálním proteomu. Identifikované IMP pocházely ze všech hlavních buněčných organel. Ukázali jsme, že kombinovaný přístup, kde jednotlivé metody cílí na skupiny IMP odlišných chemicko-fyzikálních vlastností, vede k vyššímu celkovému pokrytí membránového proteomu, než kdybychom používali jen jednu ze zvolených metod. Komplementarita zvolených metod se projevila nejen na úrovni proteinů, ale také na úrovni peptidů. Data, prezentovaná v této práci také ukázala, že volba metody přípravy membránové frakce vede nejen k rozdílům v nabohacení membránových proteinů, ale také k rozdílům v depleci cytosolických proteinů.