

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA MRŠNIK

DIPLOMSKA NALOGA

**PROUČEVANJE NIVOJA mRNA *DAPK1* V PLAZMI
BOLNIKOV S KORONARNO ATEROSKLEROZO**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA MRŠNIK

DIPLOMSKA NALOGA

**PROUČEVANJE NIVOJA mRNA *DAPK1* V PLAZMI
BOLNIKOV S KORONARNO ATEROSKLEROZO**

**PLASMA LEVEL OF mRNA *DAPK1* IN PATIENTS WITH
CORONARY ATHEROSCLEROSIS**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo (Katedra za klinično biokemijo) pod mentorstvom izr. prof. dr. Darka Černeta.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Darku Černetu za izkazano zaupanje, pripravljenost za sodelovanje in pomoč pri nastajanju diplomskega dela ter strokovno pomoč v laboratoriju, pri vrednotenju rezultatov in nasvete pri pisanju diplomske naloge.

Zahvalila bi se tudi vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo za pomoč pri delu in prijaznost v laboratoriju.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Darka Černeta.

Petra Mršnik

Sestava diplomske komisije:

Predsednik: prof. dr. Janko Kos, univ. dipl. kem.

Mentor: izr. prof. dr. Darko Černe, mag. farm., spec. med. biokem.

Član: asist. dr. Matej Sova, mag. farm.

Kazalo

KAZALO	II
POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1. UVOD	1
1.1. ATEROSKLEROZA	1
1.1.1. Koronarna ateroskleroza	1
1.1.2. Etiologija ateroskleroze	2
1.1.3. Razvoj ateroskleroze	2
1.1.4. Zapleti ateroskleroze	4
1.2. GEN DAPK1	4
1.2.1. Protein DAPK1	4
1.2.2. Mehanizem delovanja DAPK1	5
1.2.3. Apoptoza pri aterosklerozi	6
1.2.3.1. DAPK1 in apoptoza	8
1.2.4. Avtofagija pri aterosklerozi	9
1.2.4.1. DAPK1 in avtofagija	10
1.2.5. Povezava avtofagije in apoptoze	12
1.3. ZUNAJCELIČNE NUKLEINSKE KISLINE	13
1.3.1. Lastnosti zunajceličnih nukleinskih kislin	13
1.3.2. Izvor in koncentracija zunajceličnih nukleinskih kislin	13
1.3.3. Stabilnost zunajcelične mRNA	14
1.3.4. Možnosti uporabe zunajceličnih nukleinskih kislin v diagnostiki	15
1.3.5. Zunajcelične NK pri aterosklerozi	16
2. NAMEN IN DELOVNA HIPOTEZA	17
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1. VZORCI	18
3.1.1. Priprava vzorcev	19
3.2. REAGENTI IN RAZTOPINE	19
3.2.1. 1x PBS pufer	19
3.3. MATERIALI IN APARATURE	20
3.4. METODE	20
3.4.1. Izolacija NK iz plazme	20
3.4.2. Prepis v cDNA	21
3.4.3. Verižna reakcija s polimerazo v realnem času	22
3.4.4. Zanesljivost postopka	26
3.4.5. Statistična analiza	27
4. REZULTATI	28
4.1. ANALIZA PODATKOV O VZORCU	28
4.2. REZULTATI MERITEV CT IN STANDARDIZACIJA NA HIŠNI GEN	29
4.3. ANALIZA POVEZAVE PLAZEMSKEGA NIVOJA mRNA DAPK1 S STOPNJO BOLEZNI CAD	33

4.4. VPLIV DNA NA MERJENJE mRNA	36
5. RAZPRAVA.....	38
5.1. PRVA DELOVNA HIPOTEZA	38
5.1.1. <i>Vpliv časa proteolize</i>	39
5.1.2. <i>Vpliv DNA v postopkih merjenja mRNA</i>	40
5.2. DRUGA DELOVNA HIPOTEZA	40
6. SKLEP	44
VIRI IN LITERATURA	46
KAZALO SLIK	49
KAZALO PREGLEDNIC	50

Povzetek

Koronarna ateroskleroza (CAD) je vnetno degenerativna bolezen koronarnih arterij. Protein DAPK1 sodeluje v procesu apoptoze in avtofagije v gladkomišičnih celicah (GMC) aterosklerotične lehe. Apoptoza GMC ima za leho negativni učinek, ker posredno zmanjša tvorbo kolagena in naredi leho manj stabilno. Zmerna avtofagija ima pozitivno vlogo, saj regenerira poškodovane organele celice, vendar pa prekomerna avtofagija vodi v celično smrt.

V GMC aterosklerotične lehe je močno povečan (5-kratno povečanje) nivo mRNA *DAPK1* v primerjavi z nivojem v tkivu zdrave žilne stene. Glede na to, da se ob apoptotični smrti celice v plazmo sprostijo zunajcelične nukleinske kisline, smo domnevali, da v plazmi bolnikov s CAD obstaja mRNA *DAPK1* in da je njen nivo mogoče izmeriti. Druga hipoteza je bila, da imajo bolniki s CAD višji plazemski nivo mRNA *DAPK1* kot zdravi.

Nukleinske kisline iz 1 mL plazme smo izolirali 86 vzorcem (24 bolnikov s stabilnim koronarnim sindrom, 32 bolnikov z akutnim koronarnim sindromom in 30 zdravih) s komercialno dostopnim kompletom reagentov, izvedli prepis v cDNA in izmerili plazemski nivo s PCR v realnem času. Ugotovili smo, da je mRNA *DAPK1* prisotna tako v plazmi bolnih kot zdravih. Plazemski nivo smo uspešno določili 80 % vzorcem, pri 13 % je bila količina mRNA *DAPK1* prenizka, da bi jo lahko izmerili, pri 7 % pa se nivoja ni dalo zanesljivo izmeriti. Statistična analiza rezultatov je pokazala, da bolniki v celoti niso imeli zvišanih plazemskih nivojev ($p > 0,05$). Mejno zvišane nivoje mRNA *DAPK1* v plazmi smo našli le pri podskupini bolnikov s CAD, ki so imeli akutni koronarni sindrom ($p = 0,069$). Če smo omenjeno skupino primerjali le s podskupino zdravih z nizko koncentracijo CRP, je razlika postala značilna (plazemski nivo mRNA 5,051 proti 3,678; $p = 0,021$).

Glede na to, da pri bolnikih s CAD plazemski nivo mRNA *DAPK1* ni pomembneje zvišan, lahko sklepamo, da v literaturi opisan zvišan DAPK1 v GMC aterosklerotične lehe vodi v avtofagijo (regeneracijo celice žilne stene ali avtofagično smrt) in ne v njihovo apoptozo. Za potrditev naših domnev so potrebne nadaljnje raziskave.

Zaključimo lahko, da je neinvazivna metoda merjenja plazemskega nivoja mRNA *DAPK1* neprimerna za *in vivo* določanje stopnje ali spremljanje razvoja CAD, bi pa z enakim pristopom izolacije in kvantifikacije plazemskih mRNA morda lahko našli druge gene, ki bi bolje korelirali s stopnjo aterosklerotične bolezni.

Abstract

Coronary atherosclerosis (CAD) is an inflammatory disease of coronary arterial wall. DAPK1 protein mediates several cell death pathways, such as apoptosis and autophagy. Smooth muscle cell (SMC) apoptosis is detrimental for plaque stability since most of the collagen fibers are produced by SMC. Autophagy serves to either prevent further damage and counter the death stimuli or may actually facilitate cell death by excessive self-consumption.

There was an over expression of mRNA *DAPK1* (5-fold) found in human carotid endarterectomy specimen versus nonatherosclerotic arteries. Because during apoptosis cell death nucleic acids are released in blood, we expected that it will be possible to measure plasma level of mRNA *DAPK1* in patients with CAD. Our second hypothesis was that plasma level of mRNA *DAPK1* in patients will be statistically different from healthy individuals. We isolated nucleic acids from 1 mL plasma in 86 blood samples (24 patients with stabile angina, 32 patients with acute coronary syndrome and 30 healthy individuals), immediately transcribed mRNA in cDNA and made quantification by real time PCR. Our study shows the existence of cell-free mRNA *DAPK1* in plasma of not only patients with CAD but also in healthy individuals. Plasma level was successfully detected in 80 % cases, in 13 % mRNA *DAPK1* was too low to be detected and in the rest 7 % the signal was not reliable. We tested plasma level correlation within different groups. The biggest but not statistically significant difference was between patients with acute coronary syndrome and healthy individuals ($p=0,069$). When we compared plasma level of mRNA *DAPK1* in patients with acute syndrome and healthy individuals with low concentration of CRP we got significant difference (5,051 vs. 3,687; $p=0,021$).

Because of the fact that plasma level of mRNA *DAPK1* is not elevated in patients with CAD we can conclude that elevated DAPK1 most probably directs cell to autophagy (cell regeneration or autophagic death) rather than apoptosis. To confirm our theory further analyses have to be done.

We can conclude this noninvasive method of mRNA *DAPK1* plasma level detection is inappropriate for *in vivo* determination of atherosclerosis but we could use the method for isolation and quantification of mRNA plasma level to find other important genes for atherosclerotic plaque formation.

Seznam okrajšav

ACTB	aktin beta
AKS	akutni koronarni sindrom
apo A	apolipoprotein A
apo B	apolipoprotein B
CAD	koronarna ateroskleroza
cDNA	komplementarna DNA
CRP	C-reaktivni protein
Ct	število ciklov, pri katerem je presežen prag fluorescence
CT	računalniška tomografija
DAPK1	death-associated protein kinaza 1
DNA	deoksiribonukleinska kislina
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfatna dehidrogenaza
GMC	gladkomišične celice
HDL	lipoprotein visoke gostote
HeLa celice	nesmrtni tumorske celice
HMG-CoA	hidroksimetilglutaril koencim A
Il 1	interlevkin 1
INF- γ	interferon γ
LC3	protein lahke verige 3
LDL	lipoprotein nizke gostote
MCSF	makrofagni kolonije stimulirajoči faktor
min	minuta
MLC	protein lahke verige miozina
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
oLDL	oksidirani LDL
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PI(3)K	fosfatidilinozitol 3-kinaza
PKD	protein kinaza D
PPIA	ciklofilin A
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo in predhodno reverzno transkripcijo
s	sekunda
SKS	stabilni koronarni sindrom
TNF- α	tumor nekrotizirajoči faktor α
VLDL	lipoprotein zelo nizke gostote
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija

1. UVOD

1.1. ATEROSKLEROZA

1.1.1. Koronarna ateroskleroza

Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije WHO srčno žilne bolezni spadajo med najpogostejše vzroke obolevnosti in smrtnosti v razvitem svetu (1). Koronarna ateroskleroza (CAD; coronary artery disease) je napredujoča vnetno degenerativna bolezen koronarnih arterij. Klinično se manifestira v zrelih letih; letna incidenca po 40. letu je 0,5 %. Za CAD so značilna obdobja stabilne angine, ki jo prekinjajo epizode akutnega koronarnega sindroma (AKS). Akutni miokardni infarkt ali nenadna srčna smrt sta pogosto prvi in nenapovedani klinični manifestaciji bolezni. Podatki v Sloveniji kažejo, da je število smrti zaradi akutnega miokardnega infarkta približno enako tako pri moških (1,7 %) kot pri ženskah (2,3 %). Zaradi povečane obveščenosti ljudi je prva pomoč nudena prej in je zato smrtnost manjša kot v preteklosti, vendar pa imajo rešeni bolniki velikokrat kasneje ugotovljeno kronično srčno popuščanje, zato so prisiljeni k doživljenjski terapiji z zdravili, kar predstavlja velik strošek ZZZS (2).

Danes se zaradi pomanjkanja zanesljivih neinvazivnih metod odkrivanja aterosklerotičnih leh uporablja presajanje ogroženosti pacientov na podlagi prisotnih dejavnikov tveganja ter izračunane hipotetične verjetnosti za razvoj ateroskleroze ter posledičnega ishemičnega kardiovaskularnega dogodka. Uveljavljeni dejavniki tveganja so zvišana koncentracija lipoproteina nizke gostote (LDL), celokupnega holesterola, apolipoproteina B (apo B), trigliceridov in homocisteina ter znižana koncentracija lipoproteina visoke gostote (HDL) in apolipoproteina A (apo A) v serumu. Na oksidativni stres in poškodbo endotelija v žilni steni lahko kaže povišana koncentracija C-reaktivnega proteina (CRP) (3). Pomembni nelaboratorijski dejavniki tveganja za razvoj ateroskleroze so spol (k aterosklerozi so bolj nagnjeni moški, po menopavzi pa se razmerje z ženskami izenači), starost, povišan krvni tlak, kajenje, sladkorna bolezen in debelost (4).

Ostale metode odkrivanja ateroskleroze so še računalniška tomografija (CT), ki ni primerna za uporabo v primarni preventivi zaradi izpostavljenosti preiskovanca rentgenskim žarkom. Motnje v miokardialni prekrvavitvi, ki so posledica CAD, lahko zaznamo tudi z neinvazivnimi metodami kot so stresna ehokardiografija in perfuzijska

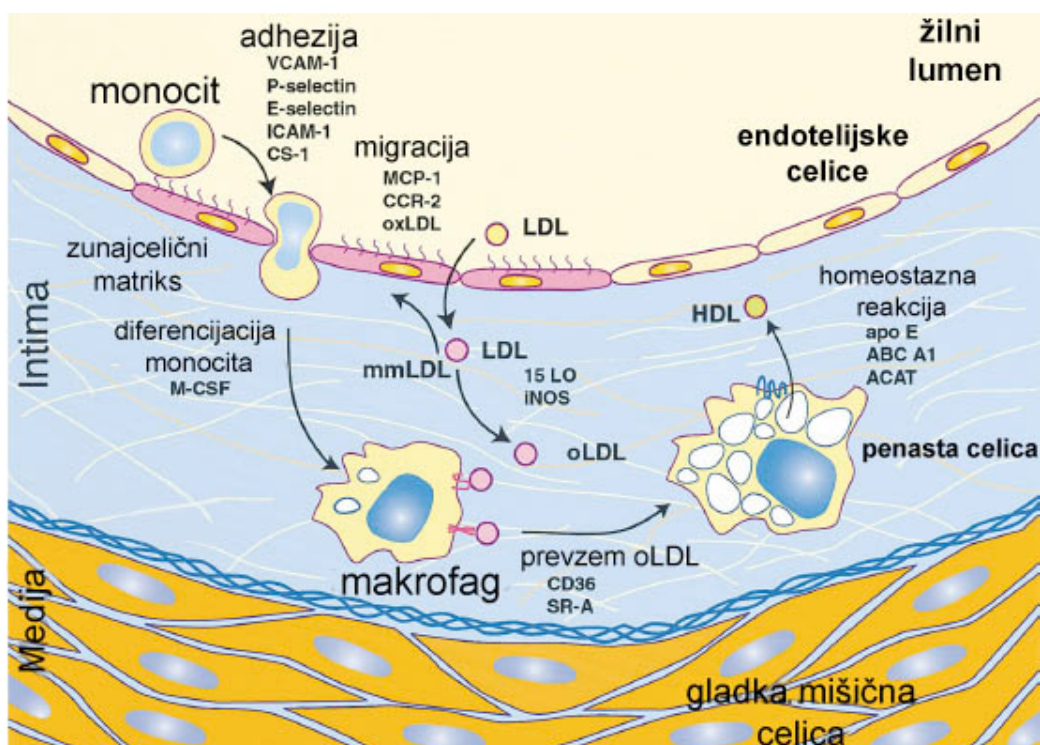
miokardna scintigrafija. Bolnikom z značilnimi simptomi in pred posegom revaskularizacije opravijo koronografijo, ki pokaže obsežne zožitve koronarnega žilja (3).

1.1.2. Etiologija ateroskleroze

Ateroskleroza je kronična vnetno degenerativna bolezen velikih in srednje velikih arterij mišičnega tipa (koronarne arterije, karotidi, arterije spodnjih udov) in velikih arterij elastičnega tipa (aorta, skupna karotidna arterija, pulmonalna arterija). Kritični dejavnik, ki odpove pri razvoju ateroskleroze, je sposobnost arterijske stene, da ohranja neprepustnost (v arterijah so pore tesne) svojega endotelija, preprečuje agregacijo trombocitov, zagotavlja hrano svoji mediji ter preko izločanja dušikovega oksida (NO) in endotelinov uravnava žilni tonus (5, 6). Prva stopnja v razvoju ateroskleroze je poškodba arterijske endotelijske celice, ki jo lahko povzročijo velike strižne sile in tlak (pri hipertenziji), imunske poškodbe, presnovne poškodbe (hipoksija endotelijske celice, endotoksini, trombin), infekcije, prosti radikali (reaktivne kisikove spojine in drugi prosti radikali) ter drugi dejavniki (5).

1.1.3. Razvoj ateroskleroze

Poškodovane endotelijske celice niso več učinkovita prepreka med plazmo in subendotelijskim prostorom. Posledica poškodbe endotelija je zvečan prehod LDL delcev. V intimi žilne stene poteka oksidacija nenasičenih višjih maščobnih kislin najpogosteje zaradi reaktivnih dušikovih in kisikovih spojin. Nastali oksidirani LDL (oLDL) zvečajo izražanje adhezivnih molekul (žilnocelične adhezijske molekule VCAM1, znotrajcelične adhezijske molekule ICAM1), P-selektina, E-selektina, monocitnega kemotaktičnega proteina-1 (MCP-1), ki privabljajo monocite, ki se med prodiranjem v intimo diferencirajo v makrofage (7). Ti izločajo citokine, kemokine, rastne faktorje, metaloproteinaze in druge hidrolitične encime (5). Makrofagni kolonije stimulirajoči faktor (MCSF), tumor nekrotizirajoči faktor α (TNF- α) in interferon γ (INF- γ) zvečajo izražanje receptorjev čistilcev (scavenger receptor, SR) (8). Afiniteta makrofagnih SR je desetkrat večja za oLDL kot za neoksidiran LDL. V nasprotju z receptorsko endocitozo LDL-a, v tem primeru ni negativne povratne zanke in se število receptorjev ne zmanjša. oLDL se kopičijo v makrofagu, kar pospešuje degeneracijo makrofaga v penasto celico (6). Shematični prikaz dogajanja ob začetku razvoja ateroskleroze je prikazan na Sliki 1.

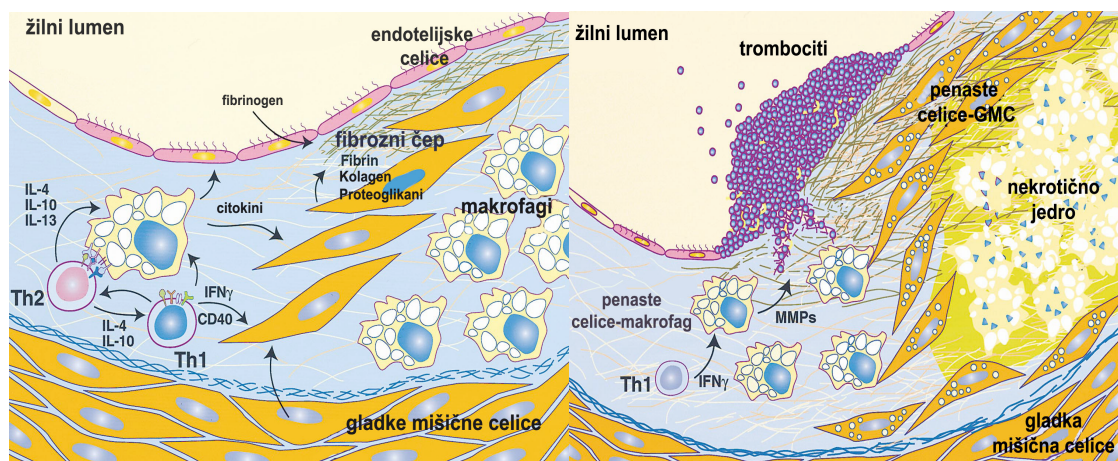


Slika 1: Adhezija monocita in diferenciacija makrofaga v začetni fazi razvoja ateroskleroze (7).

oLDL aktivirajo jedrni faktor λB (NF- λB), ki zveča izločanje vnetnih citokinov (IL-1, TNF- α in INF- γ), adhezivnih molekul, endotelina, reaktivnih kisikovih spojin in rastnih faktorjev iz makrofagov. Na VCAM1 se vežejo limfociti T, ki srečajo antigene oLDL in zato tudi ti začnejo proizvajati proinflamatorne citokine (INF- γ).

V mediji se razmnožujejo gladkomišične celice (GMC), ki zaradi vnetnega delovanja citokinov migrirajo v intimo in motijo normalno presnovo žilne stene. Na površni GMC so SR z visoko afiniteto za plazemske lipoproteine. Zaradi proliferacije GMC se zveča izločanje zunajceličnega matriksa z manj fibrilarnega kolagena, fibronektina in heparin sulfata, ki bi ob normalni količini zavirali razmnoževanje GMC. Skupaj z medceličnino, kolagenom, elastičnimi vlakni in proteoglikani sestavljajo fibrozno leho.

Morfološko se spremembo opazi kot maščobno leho, ki jo sprva sestavljajo penaste celice makrofagnega izvora, pozneje pa še penaste celice GMC. Nastane fibrozna leha, žariščno zadebeljeno nekrotično jedro s fibroznim čepom, ki je sestavljen iz penastih celic GMC in kolagenskih vlaken (7) (Slika 2).



Slika 2: Proliferacija GMC in nadaljnji razvoj ateroskleroze do fibrozne lehe (7).

1.1.4. Zapleti ateroskleroze

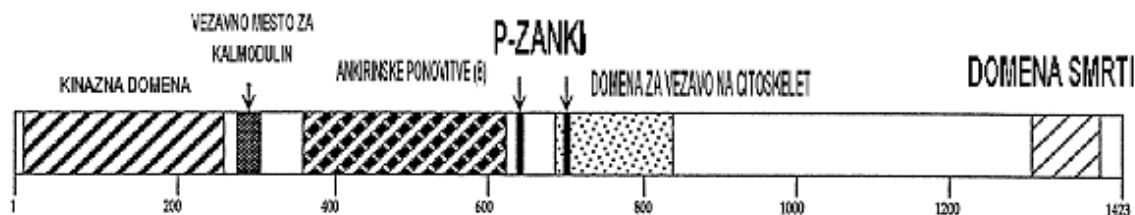
Ruptura fibrozne lehe in tromboza sta zapleta napredovane aterosklerotične lezije, ki vodita do akutnega koronarnega sindroma (miokardni infarkt, nestabilna angina pectoris ali nenadna srčna smrt) (9). Zaplet je rezultat neenakomernega oženja arterijskega lumna in rupture fibrozne lehe ob robu lezije, kjer vstopajo in se akumulirajo makrofagi. Ti zvečajo izražanje metaloproteinaz (kolagenaze, elastaze), ki razgradijo kolagenska vlakna in tako povečajo nestabilnost lehe (5). Poleg tega je zaradi apoptoze GMC tudi sinteza kolagenskih vlaken zmanjšana (10). Zmanjšana stabilnost lehe vodi do rupture. Takrat se v krvni obtok sprostijo lipidi in vezivni faktorji, kar sproži koagulacijsko kaskado, adhezijo trombocitov in trombozo (7).

1.2. Gen *DAPK1*

1.2.1. Protein *DAPK1*

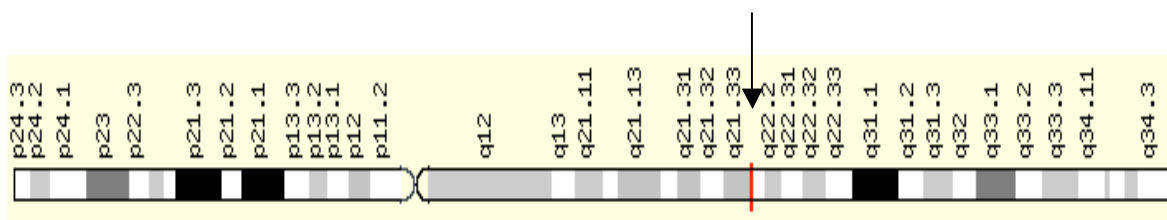
DAP kinaza 1 (death-associated protein kinase; *DAPK1*) je 160 kD velik encim, serin/treoninska kinaza. Sestavljena je iz 1423 aminokislin. *DAPK1* je prisotna na citoskeletu, in sicer je preko P-zanke pritrjena na mikrofilamente.

Protein je sestavljen iz kinazne domene, domene za vezavo Ca^{2+} /kalmodulina, osmih ankirinskih ponovitev, ki jim sledita mesti za P-zanko (Slika 3). Na 3' koncu je domena smrti, ki ji sledi zaporedje aminokislin, predvsem serini in treonini (11).



Slika 3: Shematična predstavitev proteina DAPK1 (11).

DNA zapis za *DAPK1* je lociran na 9. kromosomu, 9q21.33 (Slika 4). Dolžina gena *DAPK1* je 211.407 nukleotidov (12). Vsebuje 27 eksonov skupaj dolgih 5.886 nukleotidov.

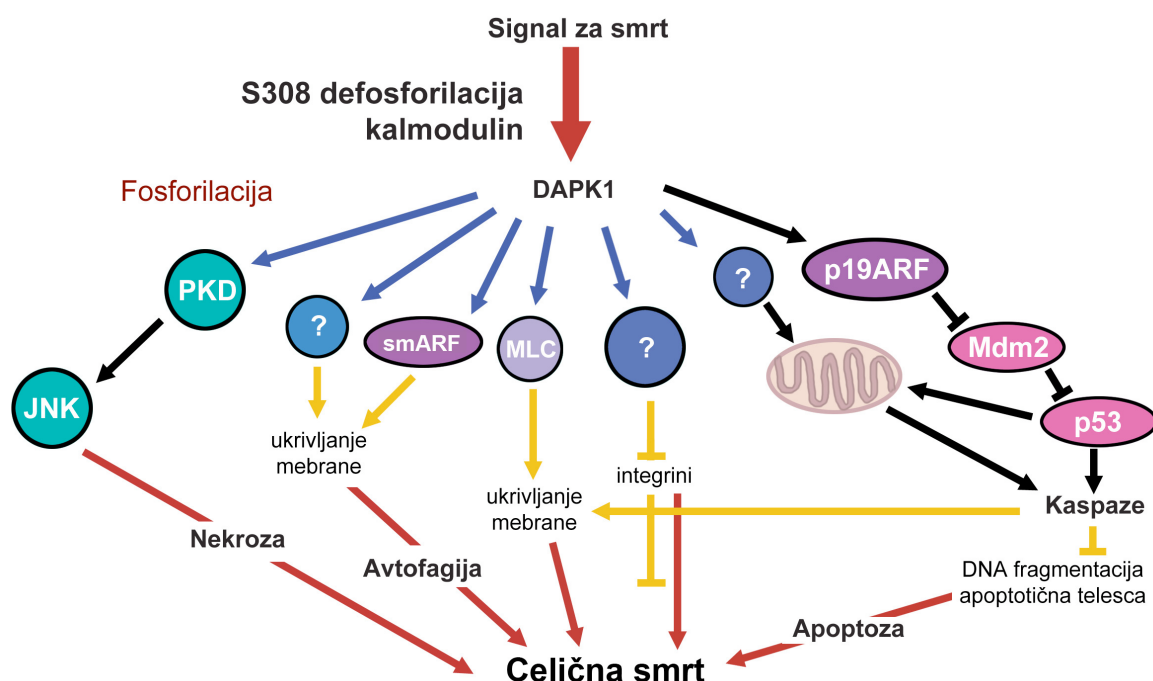


Slika 4: Lokacija *DAPK1* na 9. kromosomu (12).

1.2.2. Mehanizem delovanja DAPK1

Intrinzična aktivnost je regulirana z vezavo Ca^{2+} /kalmodulina in prisotnostjo kinazne domene. DAPK1 je sposobna avtofosforilacije in fosforilacije eksogenih substratov. Dokazano je, da DAPK1 v HeLa celicah pospeši celično smrt. Cohen in sodelavci so ugotovili, da je neregulirano zvečano izražanje DAPK1 sprožilo smrt HeLa celic brez kakršnegakoli zunanjega sprožilca (11). Aktivirana DAPK1 je pozitiven regulator apoptoze, delno preko fosforilacije p53 (13), in avtofagocitoze (avtofagije) preko zaviranja z mikrotubulom povezanega proteina 1B (MAP1B) (14). Pomoč pri celični smrti je odvisna od katalitične aktivnosti, pravilne intracelularne pritrditve na aktinske mikrofilamente in prisotnosti domene smrti (15). Naloga DAPK1 je regulacija ukrivljanja membrane med apoptozo in formacija avtofagičnih veziklov pri avtofagiji (16). Izguba aktivnosti DAPK1 je povezana z rakavimi obolenji, kot so rak mehurja in ovarijev ter levkemijo (13). Mutacije v kinazni domeni *DAPK1*, ki onemogočijo aktivacijo proteina, varujejo celice pred smrtjo, sproženo z $\text{INF-}\gamma$ (11).

DAPK1 je zaradi pozitivne regulacije celične smrti tudi tumorski supresor preko več poti; apoptoze (kaspazno odvisna pot), nekroze, avtofagije (17).



Slika 5: Mreža delovanja DAPK1 (18).

Na Sliki 5 je shematično prikazana stimulacija DAPK1 s signalom za smrt, kar povzroči defosforilacijo serina na mestu 308 (inhibitorsko avtofosforilirano mesto) (17). DAPK1 lahko deluje na več substratov. Fosforilacija proteina lahke verige miozina (MLC) je pomembna za ukrivljanje membrane pri apoptotični in avtofagični celični smrti. Fosforilacija protein kinaze D (PKD) aktivira JNK in nekrozo. DAPK1 poveča izražanje smARF, ki destabilizira membrano mitohondrija in vodi v avtofagično smrt. Za mehanizem avtofagije je pomembna tudi interakcija z beclin 1 (18), ki je pomembna za tvorbo avtofagosoma, in proteinom lahke verige (LC3) ter MAP1B (17). Mehanizem pri avtofagiji je natančneje opisan v poglavju DAPK1 in avtofagija.

1.2.3. Apoptoza pri aterosklerozi

Apoptoza je programirana celična smrt. Izvajalci apoptoze so kaspaze, ki inaktivirajo zaviralce DNaz. Glavni regulatorji apoptoze so proapoptotična Bax in Bak ter antiapoptotični Bcl-2. Apoptozo morfološko vidimo kot krčenje membrane, kondenzacijo jedrnega kromatina in fragmentacijo DNA ter končno celice. Ostanke oz. apoptotična telesca odstranijo sosednje celice, najpogostejše makrofagi (10). Proces apoptoze se lahko *in situ* v aterosklerotični lehi določi z metodo TUNEL (15) in opazovanjem morfoloških

sprememb. Z metodo TUNEL zaznamo jedra s poškodovano DNA. Označeni nukleotidi se vežejo na proste 3' OH konce DNA. V procesu programirane celične smrti specifične endonukleaze razrežejo jedrno DNA na manjše fragmente, tako je z napredovanjem procesa v jedru vedno več DNA s prostimi 3' OH konci. Metoda je zelo občutljiva in lahko zazna tudi aktivne celice z jedri, v katerih se vrši DNA prepis. V teh celicah je zato veliko RNA fragmentov. Če le ti niso prisotni, lahko sklepamo, da gre za proces apoptoze. Za zanesljive podatke je potrebno metodo TUNEL kombinirati z dodatnimi morfološkimi kriteriji (10).

Kockx in sodelavci so s pomočjo metode TUNEL ugotovili, da je nivo apoptoze celic močno povezan s stopnjo razvoja aterosklerotične lehe. *In situ* so zaznali več apoptotičnih procesov v regiji lehe z več makrofagi ali penastimi celicami makrofagnega izvora. Bennett in sodelavci so z *in vitro* študijo pokazali, da je več apoptotičnih procesov med proliferirajočimi GMC v primerjavi z neproliferirajočimi. Boyle in sodelavci so na podlagi razlike, ki je kazala več apoptotičnih procesov ob prisotnosti penastih celic makrofagnega izvora, domnevali, da naj bi makrofagi spodbujali apoptozo GMC v celični kulturi (10). Razlog za apoptozo GMC v poznejši fazi razvoja ateroskleroze je tudi povečana sinteza proapoptotičnega proteina Bax in citokini (interlevkin-1, TNF- α , INF- γ), ki jih izločajo vnetne celice. Apoptozo pospešujejo tudi oLDL in reaktivne kisikove spojine (10, 15). Za apoptotične GMC je značilno, da vsebujejo veliko kaspaz in proteina Bax. So močno fragmentirane in locirane blizu penastih celic makrofagnega izvora.

Posledica apoptoze pri aterosklerozi je odvisna od stopnje razvoja in lokacije celic v lehi. Smrt GMC vodi do zmanjšane sinteze kolagena, kar naredi leho manj stabilno. Poveča se infiltracija makrofagov (10). Makrofagi pospešijo apoptozo GMC in preko izločanja metaloproteinaz uničujejo kolagenska vlakna ter s tem zmanjšujejo stabilnost aterosklerotične lehe (19). Apoptotična telesca pogosto niso odstranjena in so zato vir kalcifikacije matriksa in nato lehe. Na površju imajo fosfatidilserin, ki deluje kot substrat za trombin.

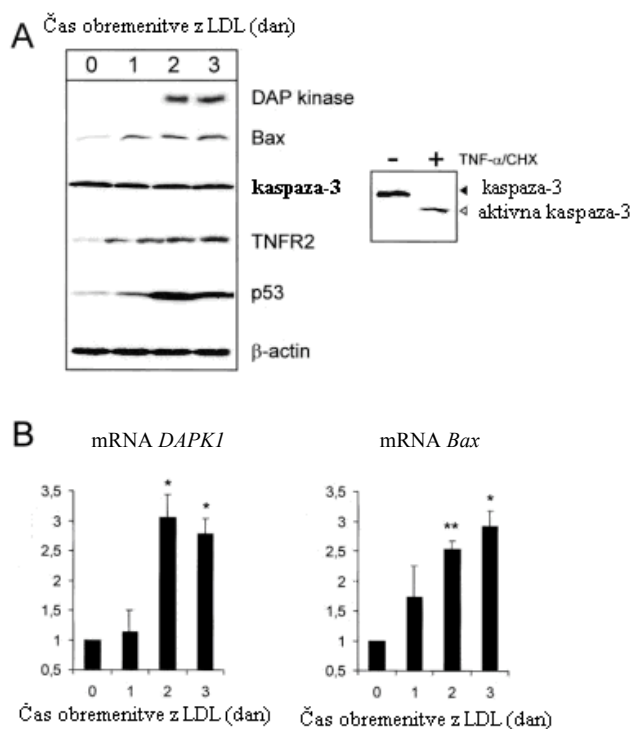
Apoptoza makrofagov zmanjša izražanje metaloproteinaz in tako zmanjša razgradnjo kolagena (10). S tega vidika je apoptoza pozitivna in pripomore k stabilnosti lehe, če so le ostanki celic in apoptotična telesca odstranjena (19).

Odstranjevanje apoptotičnih telesc je najpogostejše delo makrofagov (fagocitoza) in v manjši meri GMC. SR na makrofagih prepoznajo oksidirano membrano, poliribonukleotide, polisaharide in anionske fosfolipide, vključno s fosfatidilserinom, ki je

prisoten na zunanji membrani apoptotičnih teles. Če je apoptotično telo odstranjeno preden je poškodovana njegova membrana, bo fibrozna leha stabilna. V nasprotnem primeru bo leha nestabilna in močno podvržena trombogenezi (10).

1.2.3.1. DAPK1 in apoptoza

Martinet in sodelavci so primerjali izražanje genov, ki naj bi bili odgovorni za apoptozo v aterosklerotični lehi. Primerjali so količino mRNA v tkivu, ki so ga dobili pri karotidni endarterektomiji s tkivom iz neaterosklerotične arterije. Največje razlike so našli pri mRNA *DAPK1*, in sicer 4,97-kratno povečanje. Nato so določili še protein DAPK1. Western blot je pokazal pravilno velikost proteina (160 kD) v tkivu po karotidni endarterektomiji, medtem ko pri kontrolnem vzorcu protein skoraj ni bil zaznan. Imunohistokemična analiza je pokazala prisotnost DAPK1 v citoplazmi penastih celic nastalih iz GMC in sicer v fibroznem čepu aterosklerotične lehe. Več DAPK1 je bilo prisotne tudi v GMC, ki so bile obremenjene z lipidi. Tam je bilo tudi več proteina Bax. V makrofagih je bilo DAPK1 zelo malo. Vse celice pozitivne na DAPK1 so pregledali tudi z metodo TUNEL, ki pa ni zaznala apoptoze. Ugotovili so še, da izražanje DAPK1 v kulturi GMC zvečajo agregirani LDL in C₆-ceramid, vendar pa zvečanje samo ne sproži apoptoze (15).



Slika 6: Zvečano izražanje DAPK1 in nivoja mRNA *DAPK1* in *Bax* v GMC po obremenitvi z LDL (15).

Slika 6a prikazuje vzorce celic po obremenitvi z LDL, nanesene na elektroforezni gel ob različnih dnevih. Iz slike je razvidno zvečano izražanje DAPK1 v GMC po obremenitvi z LDL. Zvečano je tudi izražanje Bax in p53. Proces apoptoze so zavrnili z opazovanjem spremembe konformacije in dolžine kaspaze-3. V GMC je bila prisotna le neaktivna oblika kaspaze-3. Poleg tega je bila morfološka oblika GMC po treh dneh obremenitve z LDL še vedno normalna. Slika 6b prikazuje zvišanje nivoja mRNA *DAPK1* in *Bax* v odvisnosti od časa (v dnevih) obremenitve z LDL (15).

1.2.4. Avtofagija pri aterosklerozi

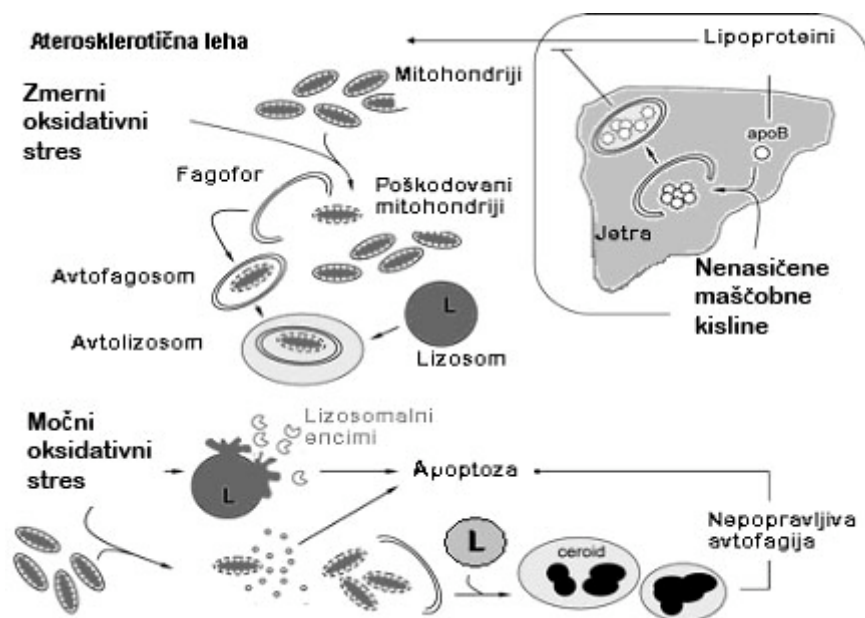
Avtofagija ali avtofagocitoza je kataboličen proces razgradnje celičnih proteinov ali poškodovanih organelov s pomočjo lizosomov. Produkti razgradnje so aminokisline, proste maščobne kisline in nukleotidi, ki jih celica lahko ponovno uporabi za sintezo proteinov. Avtofagija je natančno uravnavan proces, ki ima pomembno vlogo med rastjo celice in za ohranjanje celičnega ravnovesja pri neugodnih pogojih. Prekomerna avtofagična aktivnost lahko povzroči uničenje pomembnih organelov, mitohondrijev in endoplazemskega retikuluma, kar vodi do kolapsa celičnih funkcij.

Ena izmed oblik avtofagije je makroavtofagija. Najprej se tvori izolacijska membrana oziroma fagofor, ki se postopno podaljšuje, in objema sestavine, namenjene razgradnji (19). V prvi stopnji nastanka avtofagosoma sodeluje razred III. fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI(3)K), ki vključuje beclin 1. Pri podaljševanju membrane sta potrebna dva kompleksa: prvega sestavljajo proteini Atg 5, Atg 16 in Atg 12, drugega pa protein lahke verige 3 (LC3) (17). Konformacijske spremembe LC3 kažejo nivo spremembe v LC3-II. LC3 se nahaja na membranah avtofagosomov in se uporablja kot specifični označevalec tovrstnih vakuol v celici.

Po sklenitvi membrane nastane z dvojno membrano obdan mešiček, imenovan avtofagosom, ki se zlije z lizosomom, pri čemer nastane avtolizosom. Sestavine se znotraj avtolizosoma razgradijo do osnovnih gradnikov polimernih organskih molekul in preidejo skozi membrano avtolizosoma v citosol, kjer so lahko celici na voljo za ponovno uporabo.

Avtofagijo so pred kratkim opazili tudi v napredovani aterosklerotični lehi. *In vitro* so v GMC, makrofagih in endotelijskih celicah zaznali tipične pokazatelje avtofagije kot so pretvorba LC3I v LC3II, formacija mielina in znatna vakuolizacija. V citoplazmi umirajočih GMC fibroznega čepa pri napredovani aterosklerotični lehi so pod transmisijem elektronskim mikroskopom opazili vključke ubikinona, ki niso specifični

pokazatelj avtofagije, vendar je zaradi izolirane lokacije stradanje in zato avtofagija najbolj logična razlaga. V prid avtofagije govori tudi TNF- α , ki pospeši izražanje LC3 in avtofagičnega gena *beclin 1* ter zmerni oksidativni stres (19).



Slika 7: Shematični prikaz učinkov avtofagije v aterosklerotični lehi (20).

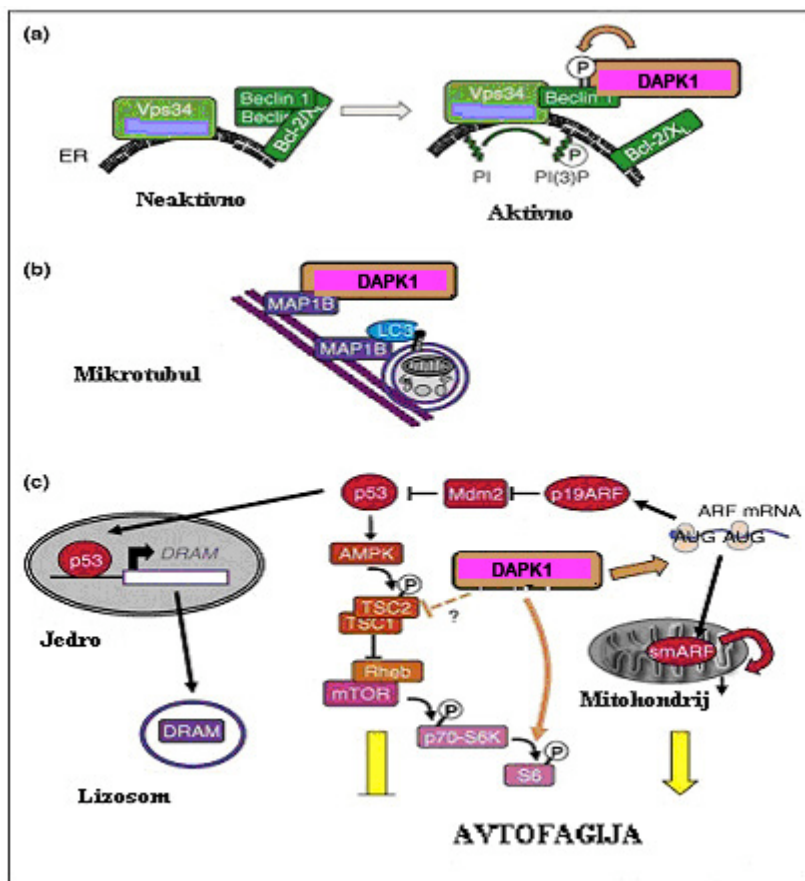
Vloga avtofagije pri aterosklerozi je neznana. Slika 7 prikazuje mehanizem pri zmernem in močnem oksidativnem stresu. Pri zmernem oksidativnem stresu varuje leho in odstranjuje poškodovane oz. oksidirane organele. Prevelika koncentracija reaktivnih spojin poškoduje tudi membrano lizosoma in tako prepreči zlitje z avtofagosomom (19). Hidrolaze se sprostijo in nadalje poškodujejo celico. Ob prisotnosti citokroma C pride do apoptoze celice (15, 19). Lahko pa pride tudi do pospešene avtofagične smrti, ko celica odstrani svoje vitalne organele (mitohondrij, endoplazmatski retikulum) (17).

1.2.4.1. DAPK1 in avtofagija

DAPK1 je ena izmed pomembnih regulatorjev avtofagije, ki jo aktivirajo citokini in celični stres endoplazmatskega retikuluma. Sodeluje pri različnih stopnjah avtofagije: ukrivljanju membrane in tvorbi avtofagosoma. DAPK1 fosforilira beclin 1 ter ga tako aktivira, vendar to ni edini regulator beclina 1 (Slika 8a). Drugi substrat je z mikrotubulom povezani protein MAP1B, ki se povezuje z avtofagosomalnim LC3II. Združena DAPK1 in MAP1B zavirata celično rast in zmanjšujeta sposobnost preživetja celice (Slika 8b).

PROUČEVANJE NIVOJA mRNA *DAPK1* V PLAZMI BOLNIKOV S CAD

DAPK1 je povezan z avtofagijo tudi posredno preko zvečanja nivoja p53 in p19ARF, ki regulirata tudi avtofagijo. p53 aktivira substrat (AMPK), ki fosforilira TSC2, ki zavira inhibitorja celične smrti mTOR. mRNA *p19ARF* zveča izražanje kratkega proteina smARF, ki depolarizira membrano mitohondrija, kar vodi v avtofagično smrt celice (Slika 8c).



Slika 8: Model regulacije avtofagije preko DAPK1 (17).

Zaenkrat še ni znano, kaj usmeri avtofagijo iz vloge pri preživetju v proces celične smrti. Nekatere študije govorijo o tem, da naj bi DAPK1 aktivirala avtofagijo kot obliko celične smrti, vendar so mehanizmi do danes neznani. Možno je, da pri celični smrti, neodvisni od kaspaz, sodelujeta DAPK1 in aktivni JNK. Možno je tudi, da avtofagijo usmerja nivo DAPK1 in ne različni substrati. Odgovor na to vprašanje bodo dale nadaljnje raziskave (17).

1.2.5. Povezava avtofagije in apoptoze

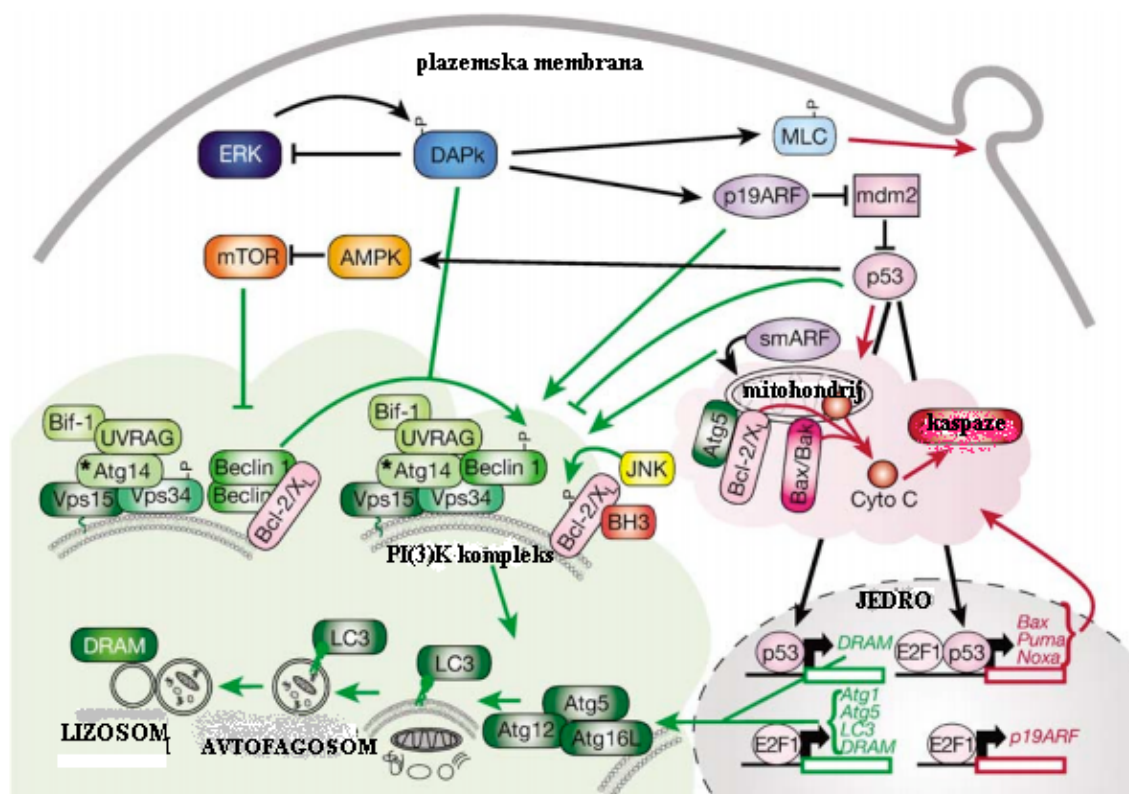
Raziskave celične smrti GMC izpostavljene prostemu holesterolu so pokazale, da gre za kompleksno obliko celične smrti, ki vključuje znake tako apoptoze kot avtofagije, v nekaterih primerih celo nekroze. Avtofagija in apoptoza sta sproženi s skupnimi sprožilci, kot je na primer poškodovani celični organel (12). Opaženih je bilo več tipov sodelovanja avtofagije in apoptoze:

1. avtofagija in apoptoza delujeta kot partnerja na poti do celične smrti

2. avtofagija je antagonist apoptoze in omogoča celično preživetje

3. avtofagija omogoča apoptozo in sodeluje v morfoloških in celičnih spremembah

Eden izmed pomembnih proteinov, ki sodeluje v obeh procesih je DAPK1 (21).



Slika 9: Prikaz regulatorjev, ki imajo vpliv na apoptozo in avtofagijo (21).

Na Sliki 9 zelene črte predstavljajo poti avtofagije, rdeče črte pa predstavljajo apoptozo. Črka P predstavlja fosforilacijo. Fosforilacija regulatornega proteina lahko verige miozina (MLC) povzroči membransko ukrivljanje. Fosforilacija beclina 1 začne avtofagijo. DAPK1 posredno preko p19ARF zviša nivo p53, ki sodeluje pri avtofagiji in apoptozi. Zunajcelična signal-regulirajoča kinaza ERK, ki fosforilira in aktivira DAPK1 je povratno regulirana s strani DAPK1 in promovira zadrževanje DAPK1 v citoplazmi celice (21).

1.3. ZUNAJCELIČNE NUKLEINSKE KISLINE

1.3.1. Lastnosti zunajceličnih nukleinskih kislin

Zunajcelične nukleinske kisline (NK) so NK, ki se nahajajo v plazmi, serumu in drugih bioloških vzorcih zunaj celice (urin, likvor, bronhialni izcedek). Zunajcelične NK imajo lastnosti celičnih NK, le da so fragmatirane. Zunajcelična DNA je dvoverižna z dolžino fragmentov od 0,5 do 21 kb, ki so strukturno povezani s histoni v mono- in oligonukleosome. V plazmi se lahko nahajajo v obliki apoptotičnih teles, mono- in oligonukleosomov, proste ali vezane na plazemske proteine (22).

1.2.2. Izvor in koncentracija zunajceličnih nukleinskih kislin

V plazmi se lahko nahaja divji tip NK normalnih jedrnih celic organizma, tumorski tip NK iz rakavih celic, fetalni tip NK iz celic ploda, humani eksogeni tip NK iz celic organa po transplantaciji in nehumani tip NK iz celic nečloveškega izvora (bakterije, glive). Lastnosti določenega tipa celic so enake NK celic, iz katerih prihajajo v zunajcelični prostor. Tumorski tip je specifičen in občutljiv tumorski označevalec. Uporablja se za zgodnjo neinvazivno diagnostiko raka, spremljanje zdravljenja in napovedovanje ponovnega obolenja. Fetalni tip NK je specifičen označevalec genskih in genomske spremembe ploda. Uporablja se za zgodnjo neinvazivno diagnostiko prirojenih bolezni, ugotavljanje spola ali določanja Rh faktorja.

Koncentracije zunajceličnih NK v telesnih tekočinah so rezultat ravnotežja mehanizmov sproščanja iz celice in mehanizmov odstranjevanja. Sprva so menili, da se DNA sprosti iz celice s pomočjo aktivnega transporta, vendar novejša raziskava nakazuje večjo verjetnost fiziološke in patološke apoptoze, kar dokazujejo z velikostjo fragmentov zunajceličnih NK. Pri bolnikih naj bi bili možni tudi drugi mehanizmi kot so liza, nekroza, spontano in aktivno sproščanje NK.

LIZA CELIC: Hipoteza o lizi cirkulirajočih rakavih celic kot prevladujočem mehanizmu izvora zunajceličnih NK je bila zavrnjena. V krvi so dokazali nekaj cirkulirajočih tumorskih celic, ki so tarče za lizo, vendar je bilo število manjše, kot bi bilo potrebno za količino tumorske NK, ki so jo dokazali v plazmi.

NEKROZA CELIC: Gre za pojav, do katerega pride pri zdravljenju raka z obsevanjem. Primerjava količine zunajceličnih NK pri bolnikih pred in po zdravljenju pri uspešnem zdravljenju je pokazala padanje koncentracije zunajceličnih NK. Pri neuspešnem

zdravljenju je koncentracija zunajceličnih NK ostala visoka ali se je celo zvišala. Pri uspešnem zdravljenju z obsevanjem bi pričakovali, da bo koncentracija zunajceličnih NK zaradi razpada rakavih celic zvišana, torej tudi nekroza ni prevladujoč mehanizem izločanja zunajceličnih NK.

APOPTOZA: Apoptoza je glavni mehanizem izločanja NK pri zdravih osebah. Izvor so krvne celice z jedrom in druge celice, ki jih v procesu apoptoze odstranijo *in situ* epiteljske celice in makrofagi. V prid apoptozi kaže direktna povezava med zvišanjem koncentracije zunajceličnih NK v plazmi ali serumu in zvišana aktivnost specifičnih enolaz in laktatne dehidrogenaze, ki sta značilna označevalca celične smrti (23).

Zunajcelične NK se iz krvnega obtoka odstranjujejo preko razgradnje z endonukleazami ali pa jih odstranjujejo celice retikuloendotelne sistema in makrofagi. Proces odstranjevanja je zelo učinkovit, zato je razpolovna doba eksogenih nukleosomov v krvi le nekaj minut, vendar pa je odstranjevanje upočasnjeno pri vezavi zunajceličnih NK na proteine. Koncentracija zunajceličnih NK v plazmi se zvišuje v patoloških procesih, ko lahko količina nukleosomov zelo poraste in je zmogljivost odstranjevanja presežena. Razpolovni čas se zato podaljša.

V plazmi zdravih ljudi je nivo koncentracije zunajcelične DNA do 50 µg/L in zunajcelične RNA do 250 µg/L, pri bolnikih pa lahko koncentracija preseže 3000 µg/L. Koncentracija fetalne DNA se kronološko spreminja v plazmi matere od 3 % v prvem trimesečju do 6 % v zadnjem trimesečju od celotne količine zunajcelične DNA v plazmi nosečnice (24).

1.3.3. Stabilnost zunajcelične mRNA

Izolacija plazemske mRNA je bila zaradi splošno znane nestabilnosti RNA presenetljiva. Encimi RNAze razgradijo RNA v nekaj sekundah, medtem ko je plazemska mRNA odvzeta z dodatkom antikoagulant EDTA, stabilna 24 ur pri temperaturi 4 °C (25). Ng in sodelavci so v študiji plazmo filtrirali skozi različno velike pore in kvantitativno določevali koncentracijo mRNA gena za gliceraldehid-3-fosfatno dehidrogenazo (*GAPDH*). Ugotovili so, da se koncentracija endogene mRNA po filtraciji skozi 0,22 µm pore značilno zmanjša. Sklepali so, da je mRNA prisotna v plazmi v obliki apoptotičnih teles, ki jo varujejo pred razgradnjo z nukleazami (26). El-Hafnawy in sodelavci so tekom karakterizacije mRNA v plazmi zaključili, da je le-ta zaščitena v obliki kompleksov s proteini, lipidnimi vezikli in apoptičnimi telesi (27).

1.3.4. Možnosti uporabe zunajceličnih nukleinskih kislin v diagnostiki

a) Zunajcelična DNA

Analiza zunajceličnih NK omogoča neinvaziven vpogled v dogajanje v tkivu oziroma organu, iz katerega zunajcelične NK izhajajo. Povišana koncentracija zunajceličnih NK v serumu se pojavlja pri patoloških stanjih: sistemski eritematozni lupus, revmatoidni artritis, glomerulonefritis, pankreatitis, vnetna črevesna bolezen in druge. Povišana koncentracija zunajcelične DNA z neoplastičnimi lastnostnostmi in mutacijami je bila odkrita tudi pri mieloplastičnem sindromu in pankreatičnem karcinomu (25). Z razvojem novih analitskih pristopov pri obravnavi rakavih bolnikov je bilo ugotovljeno, da je zunajcelična DNA enako spremenjena kot DNA v tumorskem tkivu, iz katerega izhaja. Med spremembami v zunajcelični DNA so najprej proučevali mikrosatelitske nestabilnosti in izgubo heterogenosti, kasneje pa mutacije v onkogenih in tumor-supresorskih genih, ki so značilne za tumorsko tkivo (22).

Konvencionalna prenatalna diagnostika kot je horionska biopsija ali amniocenteza predstavlja nevarnost za izgubo ploda (25), zato je analiza plodovih zunajceličnih NK v krvi matere prednost pri odkrivanju genskih in genomskih sprememb. NK ploda se v krvni obtok matere sprostijo iz poškodovanih celic posteljice, na primer trofoblastov in eritroblastov. Z današnjimi metodami jih zaznamo v 4. tednu, zanesljivo pa od 7. tedna dalje. Mnogi laboratoriji za molekularno diagnostiko imajo utečeno rutinsko določanje plodovega spola iz zunajceličnih NK (22). Plodova DNA v krvi matere se uporablja za prenatalno določanje spola, nevroloških motenj, aneuploidij (Downov sindrom, trisomije), za izključitev dedovanja na kromosom X vezanih recesivnih bolezni (hemofilija, mišična distrofija) in določanje RhD statusa (26).

b) Zunajcelična mRNA

Z uporabo reverzne transkriptaze (RT) je bilo možno detektirati mRNA v plazmi bolnikov z nazofaringealnim karcinomom, melanomom, rakom na dojkah, rakom na debelem črevesju, rakom na jetrih (25). Miura in sodelavci so merili prisotnost mRNA telomeraze pri bolnikih z rakom na jetrih. Občutljivost metode je bila 89,7 %, medtem ko mRNA pri zdravih sploh ni bila zaznana.

V krvi nosečnic so določili tudi mRNA plodu, kar omogoča nove možnosti za neinvazivno prenatalno diagnostiko. Ng in sodelavci so poročali o pomembni razliki v koncentraciji

zunajcelične mRNA kortikotropin sproščujočega hormona (CRH) pri zdravih nosečnicah in tistih s tvegano nosečnostjo (preeklampsijo).

Danes se klinična uporabnost analize zunajceličnih NK proučuje predvsem v prenatalni diagnostiki in diagnostiki rakavih obolenj, novejša strokovna objava pa nakazuje tudi uporabo pri možganski kapi, travmatskih poškodbah, sladkorni bolezni in drugih bolezenskih stanjih. Nedavno je bila objavljena raziskava o kvantitativni analizi zunajcelične DNA pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom. Desteuni in sodelavci so ugotovili, da je koncentracija DNA signifikantno zvišana pri bolnikih z miokardnim infarktom v primerjavi s skupino zdravih. Zaključili so, da bi analiza zunajcelične DNA lahko nakazovala uspeh zdravljenja zapletov (28-30).

1.3.5. Zunajcelične NK pri aterosklerozi

Sodobne raziskave so usmerjene v iskanje genov z zvečanim izražanjem v posameznih vrstah celic aterosklerotične lehe (na primer GMC), pri posameznih patofizioloških procesih v aterogenezi (proliferacija GMC) ali pri posameznih patomorfoloških oblikah bolezni (nestabilna aterosklerotična leha). Kljub številnim študijam izražanja genov do danes še ni bilo objavljenega podatka o obstoju zunajcelične mRNA genov, ki so pomembni za razvoj bolezni, v plazmi bolnikov s CAD. Ker se mnoge bolezni odražajo s spremenjeno koncentracijo in sestavo zunajceličnih NK v plazmi (22), in je apoptoza v aktivni aterosklerotični lehi pomemben proces (10), lahko domnevamo, da odmrle celice spustijo svoje NK v lumen žile oziroma kri. Sproščene NK bi lahko kazale na dogajanje v endoteliju in subendotelijskem prostoru. Kvalitativna in kvantitativna analiza zunajceličnih NK v plazmi bi omogočila neinvazivno odkrivanje nestabilnih aterosklerotičnih koronarnih leh in s tem bolnikov, ki so izpostavljeni tveganju za akutni koronarni sindrom.

2. NAMEN IN DELOVNA HIPOTEZA

Ateroskleroza spada po podatkih WHO med najpogostejše vzroke smrtnosti v razvitem svetu. Pogosto se kot prvi in nenapovedani klinični manifestaciji bolezni kažeta akutni koronarni sindrom in nenadna koronarna smrt, zato je pomembno zgodnje odkrivanje aterosklerotičnih sprememb z metodami, ki so pacientu prijazne. Analiza zunajceličnih NK omogoča neinvaziven vpogled v tkivo oziroma organ, iz katerega NK izhajajo. Njihova analiza predstavlja dopolnilo k analitiki proteinov. Z določanjem mRNA lahko sklepamo, kateri proteini se v tkivu izražajo in na ta način lahko tudi diagnosticiramo bolezensko stanje. Znano je, da je v aterosklerotični žilni steni zvečano izražanje *DAPK1*. Predvidevamo, da z različnimi mehanizmi mRNA *DAPK1* iz celic žilne stene prehaja v ekstarcelularni prostor in tudi v kri. Zunajcelična mRNA *DAPK1* v krvi bolnikov s CAD do danes še ni bila proučevana.

Naši delovni hipotezi sta:

1. V plazmi bolnikov s CAD obstaja mRNA *DAPK1* in njen nivo je mogoče izmeriti.
2. Bolniki s CAD imajo višji plazemski nivo mRNA *DAPK1* kot bolniki brez CAD.

Hipotezi bomo preverili tako, da bomo iz plazme vzorcev izolirali zunajcelične NK z uporabo novega kompleta reagentov QIAamp Circulating Nucleic Acid. Z reverzno transkripcijo bomo prepisali mRNA v cDNA in izmerili njen nivo z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Rezultate meritev bomo statistično ovrednotili in pričakujemo, da bomo hipotezi uspeli dokazati.

Potrjeni hipotezi bi pomenili, da lahko z uporabo novega analitičnega pristopa neinvazivno *in vivo* proučujemo izražanje mRNA *DAPK1* v aterosklerotični žilni steni.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Vzorci

Raziskavo smo izvedli na vzorcih 86 ljudi (30 % žensk in 70 % moških), od tega je bilo 30 zdravih, 24 bolnikov s stabilnim koronarnim sindromom (SKS) in 32 bolnikov z akutnim koronarnim sindromom (AKS). Bolniki s SKS in AKS so bili zbrani zaporedoma na Kliničnem oddelku za kardiologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, kjer so jih klinično opredelili po trenutno veljavnih smernicah. Diagnoza je temeljila na klinični anamnezi, EKG-ju, laboratorijskih meritvah in koronarni angiografiji. Koronarna ateroskleroza je bila potrjena, če je pacient imel vsaj eno stenozo (premer lumna žile se je zaradi zožitve zmanjšal za več kot 50 %) v koronarni epikardialni arteriji ali eni izmed večjih vej koronarne arterije. Pridobili so tudi podatke o terapiji z zdravili (statini, zdravila za zniževanje tlaka, aspirin) in ostalih bolezenskih stanjih (hipertenzija, sladkorna bolezen). Bolnike z vnetnimi obolenji, ledvičnimi boleznimi (če je bila koncentracija kreatinina v serumu več kot 120 $\mu\text{mol/L}$), jetrnimi boleznimi, rakom ali boleznimi ščitnice so izključili iz študije.

Zdravi posamezniki so bili naključno in zaporedno zbrani prostovoljci z manj kot 10 % tveganjem za razvoj ishemičnih koronarnih zapletov v naslednjih 10-ih letih, ki niso nikoli čutili prsne bolečine ali navajali drugih zdravstvenih težav (31).

Raziskavo je odobrila nacionalna etična komisija. Pisna soglasja so bila pridobljena od vseh sodelujočih v raziskavi.

Preglednica I: Klinične značilnosti vzorca.

	Zdravi	Stabilni koronarni sindrom	Akutni koronarni sindrom
	N=30	N=24	N=32
Spol (moški/ženska)	20/10	15/9	26/6
Povprečna starost	42	62	66
Družinska nagnjenost (ne/da)	30/0	18/6	27/5
Kajenje (ne/da)	30/0	23/1	22/10
Sladkorna bolezen (ne/da)	30/0	14/10	22/10
Statini (ne/da)	30/0	1/23	11/21
Aspirin (ne/da)	30/0	2/22	13/19

PROUČEVANJE NIVOJA mRNA *DAPK1* V PLAZMI BOLNIKOVS CAD

Antihipertenzivi (ne/da)	30/0	10/14	16/16
Koronarna arteriografija (ne/enojna/dvojna/trojna)	/	1/12/4/7	0/12/11/9

3.1.1. Priprava vzorcev

Periferna kri je bila odvzeta z dodatkom EDTA (Becton Dickinson, Velika Britanija) 12 ur po zadnjem obroku in pred koronarno angiografijo na Kliničnem oddelku za Kardiologijo (Univerzitetni klinični center Ljubljana). Da bi se izognili razgradnji mRNA in lizi celic, so vzorce v roku 1 ure po odvzemu dvakrat centrifugirali. Prvič so kri centrifugirali 10 min pri 1600 x g in 4 °C. V aseptični komori so plazmo previdno odpipetirali v novo epruveto. Sledilo je drugo centrifugiranje pri 16000 x g, 4 °C in 10 minutah. Pri obeh pipetiranjih smo za nadaljnjo uporabo odpipetirali plazmo, ki je bila najmanj 0,5 mm nad usedlino celic ali dnom epruvete. Hemoliziranih vzorcev nismo uporabili v raziskavi. Plazmo po drugem centrifugiranju smo shranili v tekočem dušiku v različno velikih alikvotih (od 220 do 850 µL).

3.2. Reagenti in raztopine

3.2.1. 1x PBS pufer

Preglednica II: 10X PBS pufer.

Sol	Masa (g)	Koncentracija (mmol/L)
NaCl	80	137
KCl	2	2,7
Na ₂ HPO ₄	14,4	10
KH ₂ PO ₄	2,4	1,76

V Preglednici II je navedena količinska sestava soli v pufru. Soli smo raztopili v 800 ml destilirane vode in uravnavali pH na 7,4. Do 1 L smo dopolnili z destilirano vodo. 100 ml 10x PBS pufra smo razredčili z destilirano vodo do 1 L in avtoklavirali. Hranili smo v hladilniku.

3.3. Materiali in aparature

1. Pipete, pipetni nastavki in mikroepruvete (Eppendorf, Nemčija), falkonke/ Centrifuge tubes RNA, DNA free (TPP, Švica), pipetni nastavki Tip One RNase free (Starlab, Nemčija)
2. Avtoklav Kambič (Kambič, Slovenija)
3. QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Nemčija)
4. QIAvac 24 Plus (Qiagen, Nemčija)
5. SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, ZDA)
6. Komora za izolacijo: Komora DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR (Biosan®, Latvija)
7. Centrifugirke: Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Nemčija), Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Nemčija), Centric 322A (Tehtnica®, Slovenija)
8. Vodna kopel: Water bath thermostat WB-4MS (Biosan®, Latvija), Cooling-heating Thermostat CH-100 (Biosan®, Latvija)
9. Hladilniki in zmrzovalniki
10. pH meter SeavenEasy S20 (Mettler Toledo, ZDA)
11. PCR/ Thermal Cycler MWG Primus 96 plus (AG Biotech, ZDA)
12. ABI PrismTM SDS 7000 (Applied Biosystem, ZDA)
13. Ploščice: 96.Well Optical Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems, ZDA)

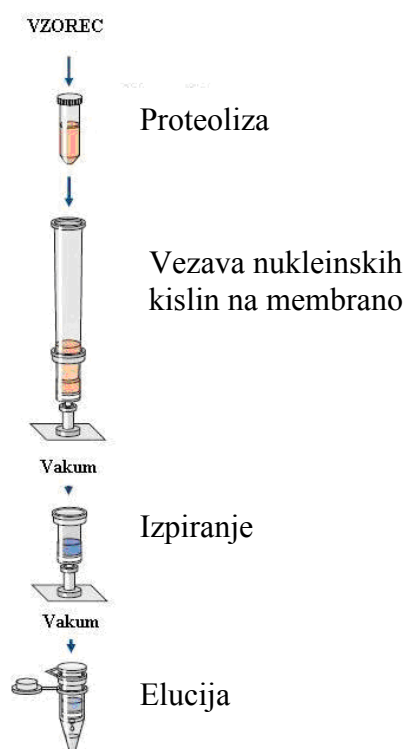
3.4. Metode

3.4.1. Izolacija NK iz plazme

NK so bile izolirane v komori, očiščeni z RNase Zap detergentom (Ambion, Applied Biosystems, ZDA) in izpostavljeni UV svetlobi za 35 min. Za izolacijo NK iz 1 mL plazme smo uporabili QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca (Purification of Nucleic Acid from 1 mL, 2 mL or 3 mL Serum or Plasma; 32). Kjer je bilo vzorca manj kot 1 mL, smo po protokolu dodajali PBS pufer do 1 mL.

PROUČEVANJE NIVOJA mRNA *DAPK1* V PLAZMI BOLNIKOVS CAD

Postopek izolacije poteka v treh korakih (Slika 10). Vzorcju smo najprej dodali proteinazo in RNA nosilec, da so se NK sprostile iz proteinov, lipidov ali veziklov. Po inkubaciji pri 60 °C za 30 min smo dodali pufer ACB za zvečanje vezave NK na silikonsko membrano. Po vezavi je sledilo trikratno izpiranje nečistoč iz kolone ter na koncu elucija NK iz kolone z AVE pufrom. Zaradi izkušenj pri prejšnjih postopkih izolacije NK iz plazme na Katedri za klinično biokemijo (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani) smo za večji izkoristek izolacije izvedli postopek z dvema modifikacijama. Pri tretjem izpiranju nečistoč iz kolone smo uporabili 97 % etanol brez RNAz (RNA free EtOH), ki smo ga hranili v hladilniku. Druga sprememba je bila dvojno izpiranje NK iz kolone s 50 µL AVE pufra. Zbrani eluat smo ponovno nanegli na kolono, inkubirali 5 min in centrifugirali 2 min pri 16000 x g (29). Takoj smo nadaljevali s prepisom mRNA v cDNA.



Slika 10: Shematični prikaz izolacije zunajceličnih NK.

3.4.2. Prepis v cDNA

mRNA v eluatu smo prepisali v cDNA s SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit-om (Invitrogen, ZDA). Najprej smo eluat inkubirali na vodni kopeli za 5 min pri 65 °C, nato pa hladili 5 min na ledu. V nadaljevanju smo sledili protokolu proizvajalca (29). Sestavo zmesi navaja Preglednica III. Za večjo učinkovitost prepisa v cDNA smo pri 42 °C

inkubirali 120 namesto 60 min. Vzorec s cDNA smo nato do kvantifikacije hranili v zamrzovalniku pri -80°C .

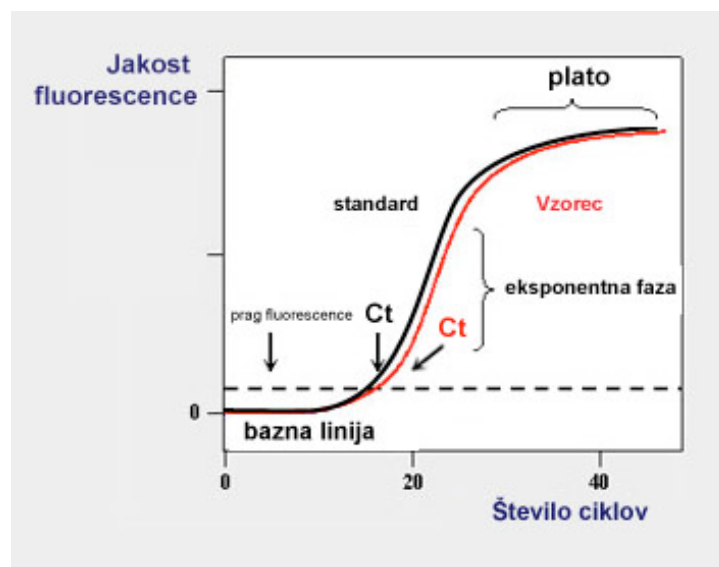
Preglednica III: Količine reagentov za reverzno transkripcijo.

5x VILO™ Reaction Mix	12 μL
10x SuperScript® Enzyme Mix	6 μL
Eluat mRNA	42 μL

3.4.3. Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Princip metode

Plazemski nivo mRNA *DAPK1* smo izmerili z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (PCR v realnem času). Teoretično se število kopij cDNA v vsakem ciklu pomnoževanja podvoji, kar zaznamo z merjenjem fluorescence. Kontinuirano spremljanje poteka reakcije v vsakem ciklu nam omogoči, da izmerimo količino produkta PCR, ko je reakcija še v eksponentni fazi. Na osnovi izmerjenih jakosti fluorescence narišemo krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov. Na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescenčnega praga, ki predstavlja tisto intenziteto, ki je značilno večja od fluorescence ozadja (Slika 11).

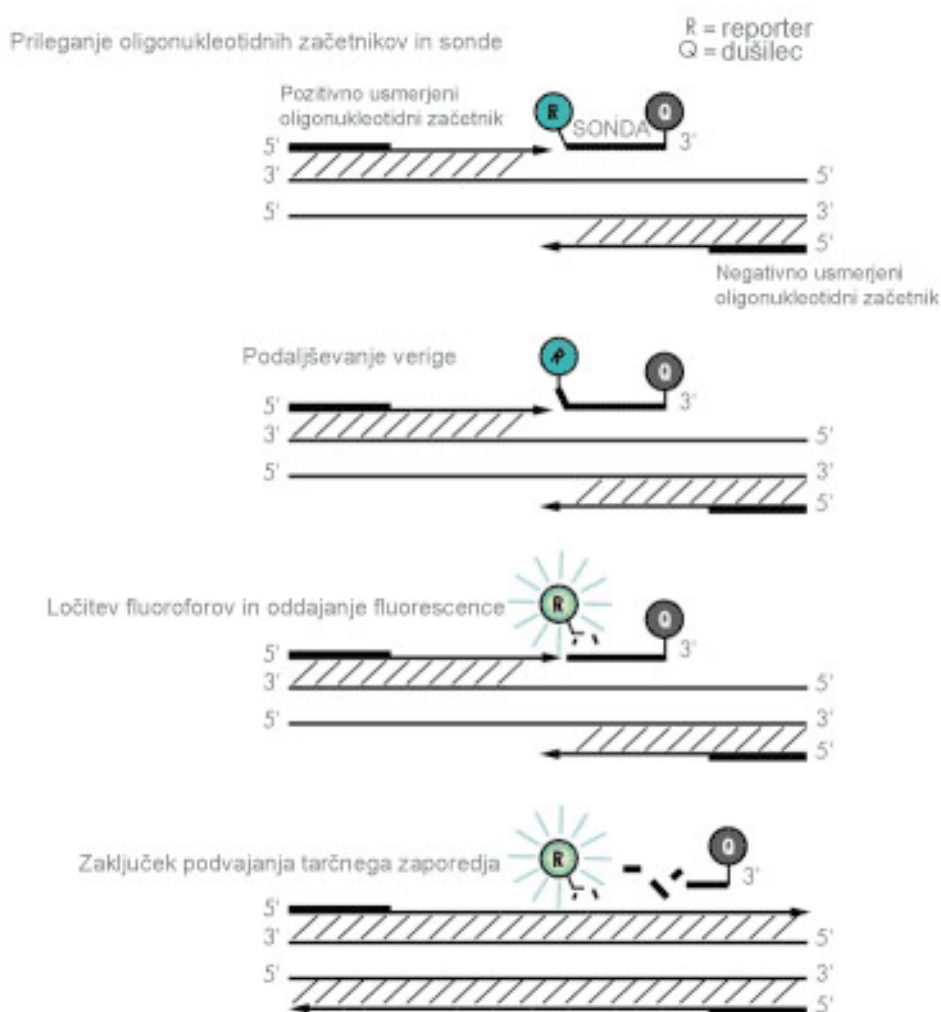


Slika 11: Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času (33).

PROUČEVANJE NIVOJA mRNA *DAPK1* V PLAZMI BOLNIKOVA CAD

Za vsak vzorec določimo cikel, pri katerem izmerjena fluorescenca preseže omenjeni fluorescenčni prag (Ct). Pri večjem začetnem številu kopij matrice signal prej doseže prag, zato določimo nižji Ct. Vrednosti Ct so obratnosorazmerne z začetnim številom kopij matrice. S primerjavo vrednosti Ct vzorcev z vrednostmi Ct standardov z znanim številom kopij matrice, lahko določimo absolutno število kopij matrice v vzorcu. Pri merjenju izražanja genov nam pogosto zadostuje podatek o razliki med vzorci, zato rezultate podajamo relativno kot razmerje med mRNA proučevanega gena in mRNA referenčnega gena, to je gena, katerega izražanje je enako pri vseh preiskovancih (neodvisno od demografskih podatkov, zdravstvenega stanja ali morebitnega zdravljenja bolezni) (34).

Poznamo več načinov detekcije produktov, pomnoženih s RT-PCR v realnem času. Nespecifični način detekcije (etidinijev bromid, SYBR Green) zazna vso dvoverižno DNA, ki je prisotna v zmesi. Pri specifičnem načinu detekcije pa se uporabljajo s fluorofori označeni oligonukleotidi, ki se vežejo le na odsek cDNA, ki ga pomnožujemo. Za meritev signala izkoriščamo FRET tehnologijo (Fluorescence resonance energy transfer) – princip fluorescentnega resonančnega prenosa energije iz donorske na akceptorsko molekulo. Uporabljata se dva fluorofora, katerih ekscitacijski in emisijski spekter se prekrivata. Ko sta fluorofora dovolj blizu, vzburljanje donorskega barvila povzroči sevanje svetlobe. Ta vzburi akceptorsko barvilo, ki posledično seva svetlobo drugačne valovne dolžine. Kot sprejemnike lahko uporabimo tudi molekule, ki absorbirajo svetlobo donorske molekule, same pa ne fluorescirajo. Za vezavo na specifične oligonukleotide se uporabljajo hidrolizirajoče in hibridizacijske sonde ter molekularna svetila (35).



Slika 12: Princip detekcije produktov pri PCR v realnem času s hidrolizirajočo sondo Taqman (36).

Za potrebe diplomske naloge smo uporabili hidrolizirajočo sondo (Slika 12), kjer izkoriščamo 5'-eksonukleazno aktivnost DNA-polimeraz. Najpogosteje se uporablja Taqman DNA-polimeraza. Sonda se v reakcijski zmesi specifično veže na tarčno zaporedje cDNA. Na obeh koncih ima vezana različna fluorofora. Na 5' koncu je vezano donorsko barvilo (reporter), ki seva fluorescenco. Na 3' koncu pa je vezano akceptorsko barvilo (dušilec), ki to fluorescenco prestreže. 5'-eksonukleazna aktivnost Taq DNA-polimeraze povzroči v stopnji podaljševanja hidrolizo sonde. Razdalja med reporterskim barvilom in dušilecem se poveča in onemogoči prestrezanje fluorescence. Fluorescenca reporterskega barvila zato poraste in je sorazmerna količini produkta PCR (35).

Potek reakcije PCR v realnem času

Reakcijsko zmes za RT-PCR v realnem času smo pripravili v komori, ki smo jo očistili s 3 % hipokloritom ter nato izpostavili UV svetlobi za 30 min. Nastavke in epruvete smo pred uporabo avtoklavirali.

Kot matrico smo uporabljali cDNA vzorcev, redčeno z dvakrat destilirano vodo (ddH₂O). Določali smo Ct za mRNA *DAPK1* in hišni gen mRNA *aktin beta* (*ACTB*). Pri določanju Ct za *DAPK1* smo vzorec redčili 1:6 in za hišni gen 1:18. Za negativno kontrolo smo uporabili vodo, s čimer smo preverjali morebitno kontaminacijo reagentov s NK. Interna kontrola je bila cDNA, prepisana iz izolirane mRNA tumorskega pljučnega tkiva. Z njo smo ugotavljali neponovljivost meritev med serijami. Vse vzorce smo delali v trojnikih. Sestavo reakcijske zmesi predstavlja Preglednica IV.

Preglednica IV: Količine reagentov za eno reakcijo RT-PCR v realnem času.

FastStart Universal Probe Master (Roche Applied Science, ZDA)	12,5 µL
Oligonukleotidni začetniki in hidrolizirajoča sonda za tarčni gen <i>DAPK1</i> (Hs00234489_m1, eksonska vezava 3-4, dolžina amplifikacije 105) *	0,75 µL
ali hišni gen <i>ACTB</i> (4333762T, dolžina amplifikacije 171)*	
Vzorec cDNA	11,75 µL

Vsi oligonukleotidni začetniki in hidrolizirajoče sonde so bili naročeni pri proizvajalcu Applied Biosystems (ZDA). Dobavitelj zagotavlja, da so začetniki in sonde specifične za mRNA in naj bi bila DNA nemoteča. Kljub temu smo specifičnost reagentov dodatno sami preverili.

Na mikrotitrsko ploščico za PCR s 96 vdolbinicami (Applied Biosystems, ZDA) smo najprej nanесли master mix (Probe master, sonda in oligonukleotidni začetniki), dodali vodo, interno kontrolo ali razredčen vzorec, da je skupni volumen v posamezni vdolbinici znašal 25 µL. Ploščico smo nato prelepili s prozorno samolepilno folijo, njeno vsebino pretresli na vibracijskem mešalu in centrifugirali 2 min pri 1900 obratov. Ploščico smo nato vložili v ciklični termostat ABI PrismTM SDS 7000, kjer je potekal PCR v realnem času.

PROUČEVANJE NIVOJA mRNA *DAPK1* V PLAZMI BOLNIKOVS CAD

Reakcija pomnoževanja se je začela z 2 min inkubacije pri 50 °C in nadaljevala z 10 min začetne denaturacije cDNA pri 95 °C. Sledilo je 45 ciklov s temperaturnim profilom: denaturacija cDNA 15 s pri 95 °C ter prileganje oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanje verige 1 min pri 60 °C.

Najprimernejši hišni gen so določili predhodno s ploščico in reagenti TaqMan Human Endogenous Control Plate (Applied Biosystems, ZDA), kjer se testira 11 kandidatnih genov in pozitivna kontrola. Nivo hišnega gena mora biti vedno enak, ne glede na prisotnost bolezni, variabilnost vzorca ali eksperimentalne pogoje. Na ploščico so nanesti 8 najbolj variabilnih vzorcev. Računalniški program v posameznih korakih izloči gen, ki v danem koraku najbolj odstopa od geometričnega povprečja Ct vseh genov. Na koncu ostaneta dva gena, ki se enako izražata v vseh vzorcih, neodvisno od demografskih podatkov in kliničnega stanja preiskovancev. S standardizacijo tarčnega gena na hišni gen istočasno zmanjšamo tudi variabilnost rezultatov analize, ki izhaja iz razlik v samem analiznem postopku, predvsem v postopku izolacije, kot je na primer razlika v volumnu uporabljene plazme, učinkovitosti proteaze, variabilnosti temperatur in drugih.

Analiza rezultatov

Podatke, dobljene s PCR, smo analizirali s programom 7000 System SDS Software. Program je podal vrednost Ct glede na izmerjeni fluorescenčni signal in nastavljeno bazno linijo ter prag. Ct smo določali v trojnikih. Meritve smo ponavljali, dokler ni bila ponovljivost Ct manj kot 0,6 %. Vrednosti smo prenesli v Microsoft Excel in izračunali povprečno vrednost Ct. Vrednost Ct tarčnega gena *DAPK1* smo standardizirali na hišni gen *ACTB* (37). Najprej smo izračunali $\Delta Ct = Ct(DAPK1) - Ct(ACTB)$ ter poiskali vzorec z najmanjšo razliko ΔCt_{min} . Plazemski nivo je razmerje števila molekul mRNA *DAPK1* glede na število molekul mRNA hišnega gena v istem vzorcu (ΔCt) in izražen kot mnogokratnik najmanjšega ΔCt v vseh vzorcih raziskave (ΔCt_{min}). Dobimo ga z enačbo: plazemski nivo *DAPK1* = $2^{(\Delta Ct - \Delta Ct_{min})}$.

3.4.4. Zanesljivost postopka

Da bi izključili vpliv genomske DNA na merjenje Ct in preverili specifičnost sonde ter oligonukleotidnih začetnikov TaqMan Gene Expression Assay za mRNA *DAPK1*, smo izvedli PCR na vzorcih z izoliranimi NK. Dva vzorca smo razdelili na dva alikvota. Prva

PROUČEVANJE NIVOJA mRNA *DAPK1* V PLAZMI BOLNIKOVA S CAD

aliquota smo prepisali v cDNA z vsemi reagenti, drugima dvema pa pri reverzni transkripciji nismo dodali encima reverzne transkriptaze. Z RT-PCR v realnem času smo merili nivo mRNA *DAPK1*. Nato smo alikvote, kjer je prišlo do pomnoževanja nanesti na agarozni gel in z elektroforezo preverili, ali se je pri prvem alikvotu res pomnoževal oligonukleotid pričakovane dolžine, kot je naveden v specifikaciji reagentov za določevanje mRNA *DAPK1*.

Kontaminacijo reagentov smo preverjali z dodajanjem vode (negativna kontrola) namesto vzorca.

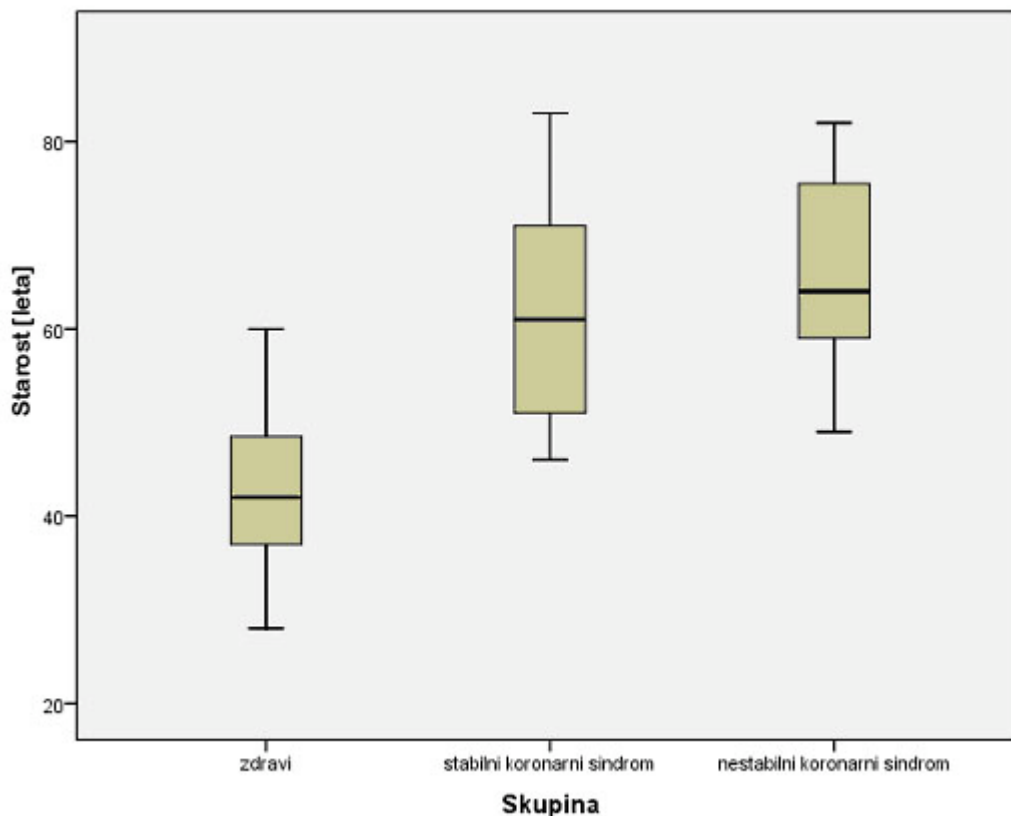
3.4.5. Statistična analiza

Rezultati so predstavljeni kot mediana s 25. in 75. percentilom in razponom vrednosti. Za primerjavo parametrov med skupinama s klinično izraženo boleznijo in zdravo populacijo smo uporabili naparametrični Mann-Whitneyev U-test. Povezave med parametri smo ocenili s Spearmanovo korelacijo rangov ali regresijsko analizo. Vse statistične analize smo izvedli s SPSS v.17.0. (SPSS Inc., ZDA). Pri vseh testih smo kot statistično pomembno opredelili vrednost pri 5 % statističnem tveganju ($p < 0,05$). Za obdelavo podatkov in risanje preglednic smo uporabili Microsoft Excel (Microsoft, ZDA).

4. REZULTATI

4.1. Analiza podatkov o vzorcu

V analizi je sodelovalo 86 ljudi. Podatke o spolu in starosti smo pregledno ločili glede na skupino (zdravi, bolniki s stabilnim koronarnim sindromom in bolniki z akutnim koronarnim sindromom) (Slika 13, Preglednica V).



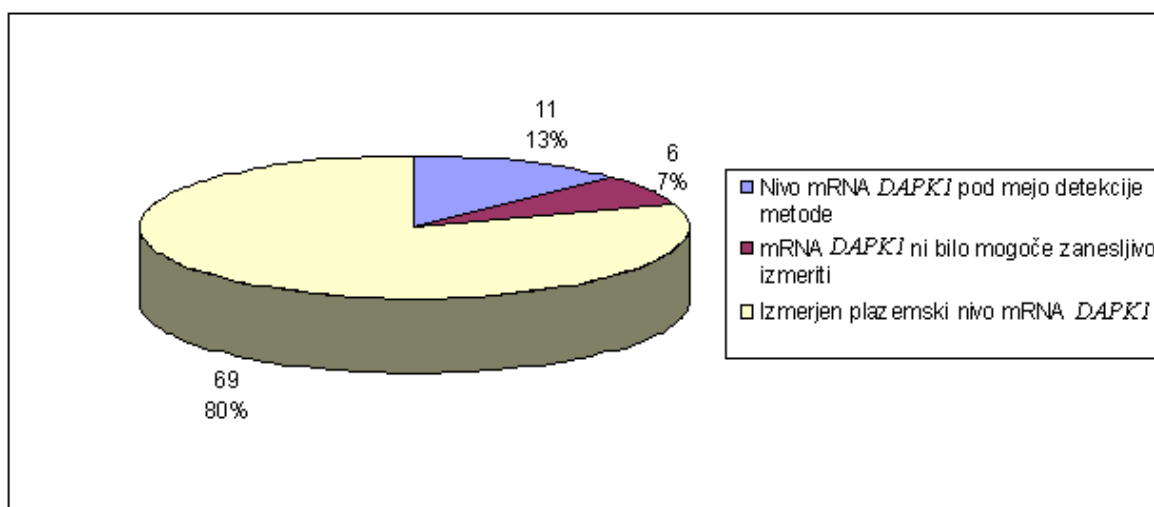
Slika 13: Predstavitev porazdelitve starosti vzorca glede na bolezensko stanje.

Preglednica V: Predstavitev podatkov o spolu in starosti glede na bolezensko stanje.

	Zdravi	Stabilni koronarni sindrom	Akutni koronarni sindrom
Ženski spol	10	9	6
Moški spol	20	15	26
Povprečna starost	42	62	66
25-75 percentil	36,5-49	50,5-71	59-76

4.2. Rezultati meritev Ct in standardizacija na hišni gen

86 vzorcem plazme smo nivo plazemske mRNA *DAPK1* izmerili z metodo RT-PCR v realnem času. Ct smo zanesljivo izmerili pri 69 vzorcih (80 %). Pri 6 (7 %) vzorcih se vsaj v eni meritvi trojnika signala ni dalo izmeriti. Tudi pri ponavljanju meritve so bili podatki nezanesljivi (ali Ct-ja ni bilo možno določiti ali pa je bila standardna devianca vseh treh meritev previsoka). Pri 11 (13 %) vzorcih nismo dobili signala pri vseh meritvah v trojniku, kar pomeni, da je bila količina mRNA *DAPK1* v plazmi premajhna, da bi lahko izmerili Ct (Slika 14).



Slika 14: Predstavitev deleža izmerjenih nivojev mRNA *DAPK1* v plazmi.

Meritvam trojnikov smo v Excelu izračunali povprečni Ct za mRNA *DAPK1* in hišni gen *ACTB*. Izračunani povprečni Ct za mRNA *DAPK1* smo standardizirali glede na povprečje Ct mRNA *ACTB*. Rezultati meritev povprečnega Ct za mRNA *DAPK1* in mRNA *ACTB* ter relativni plazemski nivo so podani v Preglednici VI.

Preglednica VI: Povprečni Ct in izračun relativnega plazemskega nivoja mRNA *DAPK1*.

Številka vzorca	Skupina	Ct (<i>DAPK1</i>)	Ct (<i>ACTB</i>)	ΔCt <i>DAPK1-ACTB</i>	$2^{-(\Delta Ct - \Delta Ct_{min})}$
1	2	35,89	29,61	6,28	3,03
2	2	37,79	30,67	7,12	1,69
3	2	38,2	30,9	7,30	1,49
4	3	35,68	29,5	6,18	3,25
5	3	37,74	31,67	6,07	3,51
6	3	38,2	32,11	6,09	3,46

PROUČEVANJE NIVOJA mRNA *DAPK1* V PLAZMI BOLNIKOVA S CAD

7	3	38,57	32,86	5,71	4,50
8	3	37,74	32,3	5,44	5,43
9	3	37,14	30,15	6,99	1,85
10	2	37,01	32,34	4,67	9,25
11	2	35,1	30,96	4,14	13,36
12	2	36,51	31,46	5,05	7,11
13	3	36,57	31,68	4,89	7,94
14	3	36,97	30,55	6,42	2,75
15	2	38,26	31,37	6,89	1,99
16	2	37,73	31,73	6,00	3,68
17	2	37,94	32,22	5,72	4,47
18	3	37,53	31,45	6,08	3,48
19	2	NI	35,17		
20	3	NI	34,77		
21	2	NI	32,49		
22	2	37,11	29,5	7,61	1,21
23	2	Nmd	31,36		
24	2	36,93	31,88	5,05	7,11
25	3	NI	33,84		
26	3	38,06	32,47	5,59	4,89
27	2	36,32	30,72	5,60	4,86
28	2	37,67	33,5	4,17	13,09
29	3	37,46	31,82	5,64	4,72
30	3	38,22	32,3	5,92	3,89
31	3	NI	32,38		
32	3	37,64	32,22	5,42	5,50
33	3	38,52	32,26	6,26	3,07
34	3	38,57	32,31	6,26	3,07
35	3	37,52	32,29	5,23	6,28
36	3	38,2	33,97	4,23	12,55
37	3	37,85	32,95	4,90	7,89
38	2	36,52	31,88	4,64	9,45
39	3	37,69	31,21	6,48	2,64
40	3	38,22	32,07	6,15	3,32
41	3	38,85	33,3	5,55	5,03
42	3	NI	31,77		
43	3	38,69	32,93	5,76	4,35
44	3	38,21	34,46	3,75	17,51
45	2	37,5	32,1	5,40	5,58
46	2	NI	34,61		
47	2	36,5	31,36	5,14	6,68
48	2	37,67	30,52	7,15	1,66
49	3	NI	33,27		
50	3	38,64	31,95	6,69	2,28
51	2	37,41	31,01	6,40	2,79

PROUČEVANJE NIVOJA mRNA *DAPK1* V PLAZMI BOLNIKOVS CAD

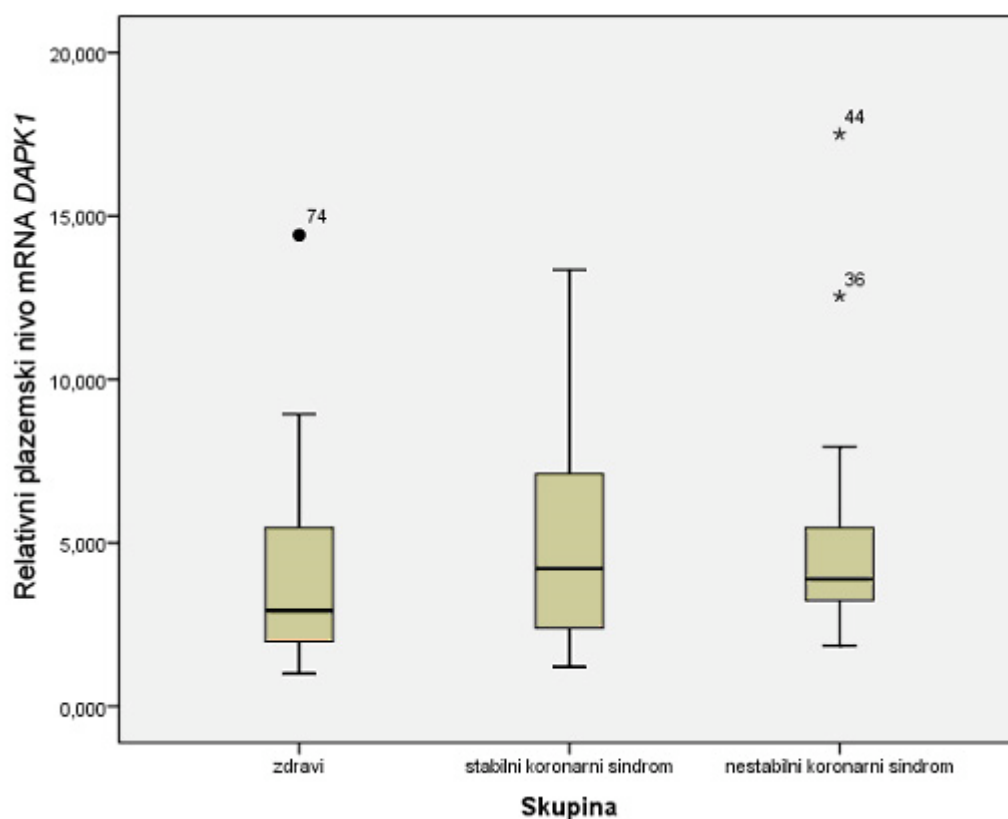
52	3	38,61	32,64	5,97	3,76
53	2	39,18	33,28	5,90	3,94
54	2	36,25	29,98	6,27	3,05
55	3	35,77	30,53	5,24	6,23
56	3	38,32	32,13	6,19	3,23
57	1	35,45	28,55	6,90	1,97
58	1	39,16	31,44	7,72	1,12
59	1	38,42	31,93	6,49	2,62
60	1	NI	34,01		
61	1	37,96	31,58	6,38	2,83
62	1	39,3	33,88	5,42	5,50
63	1	37,4	30,17	7,23	1,57
64	1	Nmd	29,65		
65	1	37,08	30,5	6,58	2,46
66	1	Nmd	31,87		
67	1	37,25	31,92	5,33	5,86
68	1	Nmd	33,14		
69	1	NI	32,59		
70	1	NI	34,06		
71	1	35,78	29,84	5,94	3,84
72	1	37,33	32,61	4,72	8,94
73	1	36,78	30,5	6,28	3,03
74	1	35,1	31,07	4,03	14,42
75	1	36,37	30,94	5,43	5,46
76	1	38,4	31,32	7,08	1,74
77	1	Nmd	32,24		
78	1	37,24	31,57	5,67	4,63
79	1	36,29	30,35	5,94	3,84
80	1	39,17	32,72	6,45	2,69
81	1	39,35	32,91	6,44	2,71
82	1	37,26	32,21	5,05	7,11
83	1	39,22	32,31	6,91	1,96
84	1	39,99	32,11	7,88	1,00
85	1	Nmd	32,22		
86	1	38,13	32,03	6,10	3,43

Nmd=prevelika variabilnost Ct-ja

NI= nivo mRNA *DAPK1* prenizek, da bi ga lahko izmerili

Skupine pomenijo 1=zdravi, 2=stabilni koronarni sindrom in 3=akutni koronarni sindrom

PROUČEVANJE NIVOJA mRNA *DAPK1* V PLAZMI BOLNIKOVS CAD



Slika 15: Plazemski nivo mRNA *DAPK1* standardiziran na nivo mRNA *ACTB* po skupinah.

Slika prikazuje najmanjše in največje vrednosti plazemskega nivoja mRNA *DAPK1*, kvartile ter mediano za posamezni plazemski nivo v skupini vzorcev. Prikazani so tudi osamelci (•), ki so zunaj intervala $Q_3 + 1.5Q$ in ekstremni osamelci (*), ki so zunaj intervala $Q_3 + 3Q$.

Preglednica VII: Vrednosti mediane plazemskega nivoja mRNA *DAPK1*, 25. in 75. percentil ter najnižje in najvišje vrednosti za posamezne skupine.

Plazemski nivo mRNA <i>DAPK1</i>	Skupina*	Mediana	25.-75. percentil	Najnižja/najvišja vrednost
<i>DAPK1/ACTB</i>	1	2,93	1,97-5,47	1,00/14,42
	2	4,21	2,19-7,11	1,21/13,36
	3	3,89	3,23-5,50	1,85/17,51

Skupina* pomeni: 1=zdravi, 2=stabilni koronarni sindrom in 3=akutni koronarni sindrom.

4.3. Analiza povezave plazemskega nivoja mRNA *DAPK1* s stopnjo bolezni CAD

Z uporabo statističnih metod smo želeli preveriti plazemski nivo mRNA *DAPK1* pri bolnikih in ga primerjati z nivojem pri zdravih. Najprej smo izvedli test za normalnost distribucije. Kolmogorov-Smirnov test ($N < 50$) je pokazal, da plazemski nivo mRNA *DAPK1* ni normalno porazdeljen ($p < 0,05$, Preglednica VIII), razen pri skupini bolnikov s stabilnim koronarnim sindromom. Homogenost variance smo preverjali z Lavenovim testom ($p > 0,05$), ki kaže na nehomogenost variance med skupinami plazemskega nivoja mRNA *DAPK1*.

Preglednica VIII: Test normalnosti distribucije plazemskega nivoja mRNA *DAPK1*.

Plazemski nivo mRNA <i>DAPK1</i>	Skupina	Kolmogorov-Smirnov test p
	zdravi	0,015
	stabilni koronarni sindrom	0,200
	nestabilni koronarni sindrom	0,001

V nadaljnji analizi smo uporabili naparametrični Mann Whitneyev U-test, ki kot predpostavko zahteva le neodvisnost vzorcev za primerjavo povezave med stopnjo bolezni in plazemskim nivojem mRNA *DAPK1* (Preglednica IX).

Preglednica IX: Predstavitev rezultatov neparametričnega Mann Whitneyevega U-testa.

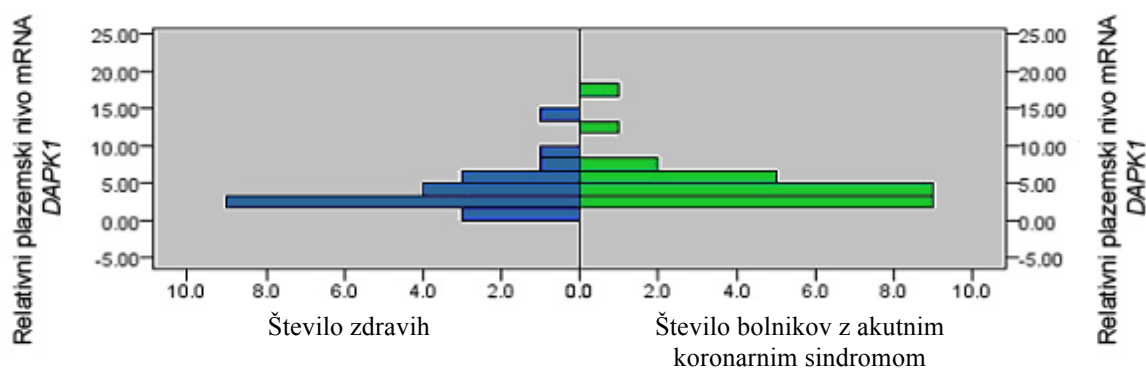
Skupine*	Neparametrični Mann Whitneyev U-test Plazemski nivo mRNA <i>DAPK1</i>
1 proti 2	0,222
1 proti 3	0,069
2 proti 3	0,880

Skupine*: 1=zdravi, 2=stabilni koronarni sindrom, 3=akutni koronarni sindrom.

Iz analize podatkov z neparametričnim Mann Whitneyevim U-testom smo ugotovili, da med plazemskim nivojem mRNA *DAPK1* in stopnjo bolezni ni signifikantne povezave (vedno $p > 0,05$). Mejno pomembno razliko smo opazili le med zdravimi in bolniki z

PROUČEVANJE NIVOJA mRNA *DAPK1* V PLAZMI BOLNIKOV S CAD

akutnim koronarnim sindromom (Slika 16). Bolniki z akutnim koronarnim sindromom so imeli v povprečju za 25 % (plazemski nivo 5,051/4,033, srednja ranga 28,35/20,89) višji nivo mRNA *DAPK1* v plazmi kot zdravi, vendar razlika ni dosegla statistično pomembne razlike ($p=0,069$). Razliko smo v nadaljevanju natančneje analizirali.

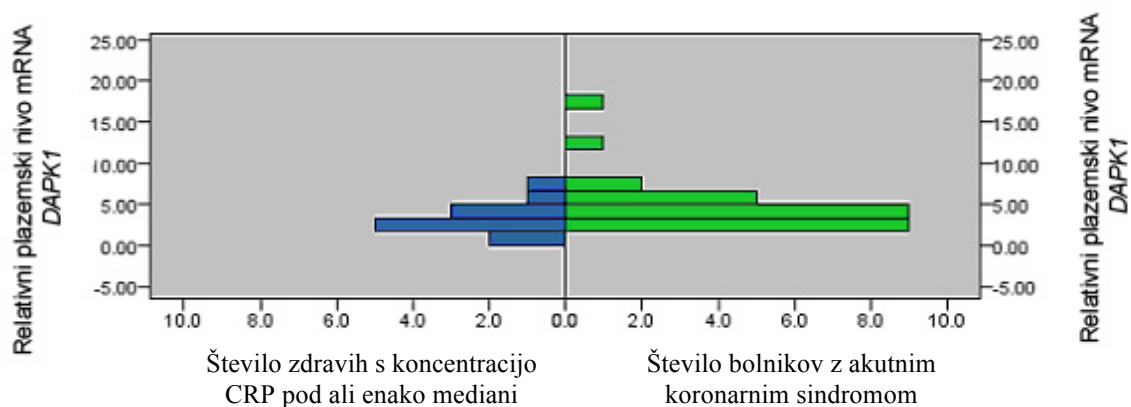


Slika 16: Prikaz porazdelitve plazemskega nivoja mRNA *DAPK1* po rangih v skupini zdravih in skupini bolnikov z akutnim koronarnim sindromom.

Pri razvoju aterosklerotične lehe ima pomembno vlogo vnetje, zato smo želeli preveriti povezavo koncentracije CRP s plazemskim nivojem mRNA *DAPK1*. Zdrave smo razdelili na dve podskupini glede na mediano koncentracije CRP, in sicer na skupino zdravih s koncentracijo CRP enako ali nižjo od mediane in skupino zdravih s koncentracijo CRP višjo od mediane. Statistično povezavo smo preverili ponovno z neparametričnim Mann Whitneyevim U-testom.

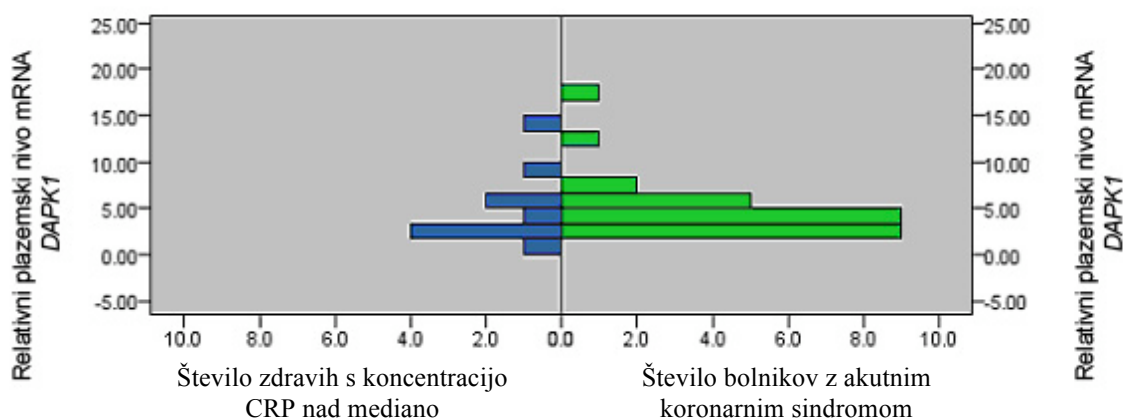
Mediana koncentracije CRP pri skupini zdravih je 1,25 mg/L. Primerjava skupine bolnikov z akutnim koronarnim sindromom in podskupine zdravih s koncentracijo CRP nižjo ali enako mediani je pokazala, da imajo bolniki v povprečju za 36,99 % (plazemski nivo 5,051/3,687; srednja ranga 22,81/13,67) višji plazemski nivo mRNA *DAPK1* kot zdravi ($p=0,021$, Slika 17).

PROUČEVANJE NIVOJA mRNA *DAPK1* V PLAZMI BOLNIKOVS CAD



Slika 17: Prikaz porazdelitve plazemskega nivoja mRNA *DAPK1* v skupini zdravih s koncentracijo CRP pod ali enako mediani vseh vrednosti pri zdravih in skupino bolnikov z akutnim koronarnim sindromom.

Nasprotno pa nismo našli razlik med plazemskim nivojem mRNA *DAPK1* v skupini zdravih s koncentracijo CRP nad mediano in skupini bolnikov z AKS ($p > 0,05$, Slika 18).



Slika 18: Prikaz porazdelitve plazemskega nivoja mRNA *DAPK1* v skupini zdravih s koncentracijo CRP v plazmi nad mediano vseh vrednosti pri zdravih in skupino bolnikov z akutnim koronarnim sindromom.

Nadalje smo naredili multivariantno linearno regresijo, in sicer stopenjsko in vzvratno. Potrdila je opažanja univariantne analize, da noben od opazovanih parametrov ne korelira pomembneje s plazemskim nivojem mRNA *DAPK1*.

4.4. Vpliv DNA na merjenje mRNA *DAPK1*

Pri postopku izolacije mRNA iz plazme smo s kompletom reagentov QIAamp Circulating Nucleic Acid izolirali vse NK, zato smo testirali, ali so reagenti specifični za mRNA *DAPK1* in DNA *DAPK1* v reakciji ne reagira.

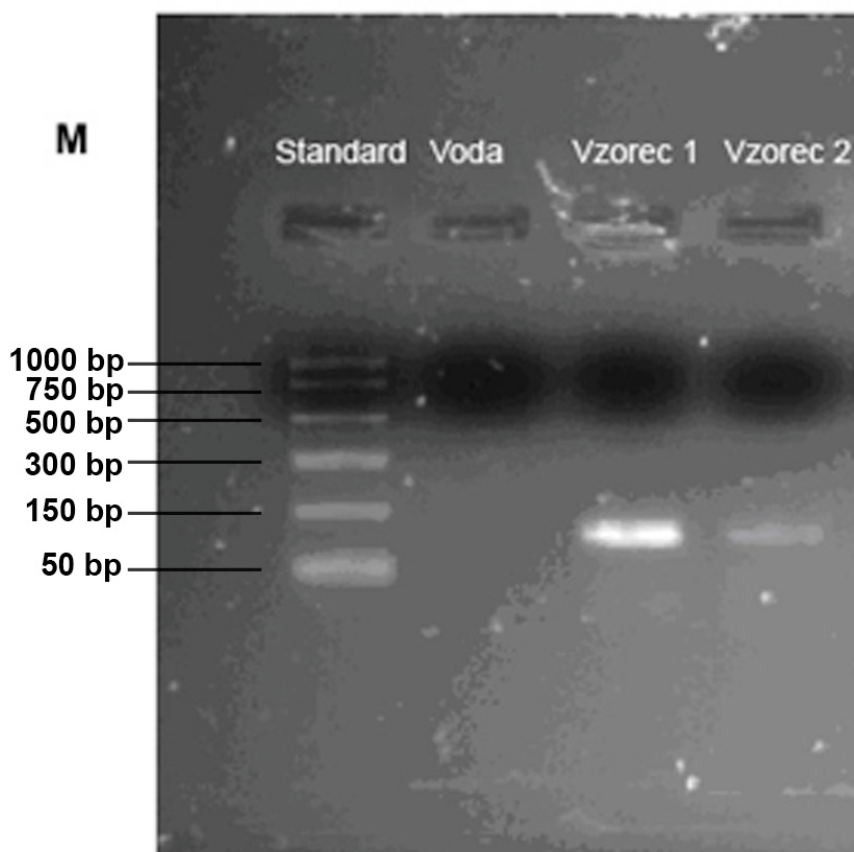
Po izolaciji NK s QIAamp Circulating Nucleic Acid smo dva vzorca razdelili na dva alikvota. Pri prvih dveh alikvotih smo izvedli prepis mRNA v cDNA z vsemi reagenti, pri drugih dveh alikvotih pa smo izvedli prepis brez encima reverzne transkriptaze. V tema dvema vzorcema tako ni bilo cDNA temveč le DNA. Z metodo PCR v realnem času smo merili Ct oz. nivo mRNA *DAPK1* v vzorcih.

Pri alikvotih, kjer smo pri prepisu v cDNA dodali encim reverzno transkriptazo smo z RT-PCR v realnem času dobili izmerjene Ct-je pri vseh trojnikih. Nasprotno pa pri alikvotih, ki jim nismo dodali reverzne transkriptaze, med RT-PCR v realnem času ni prišlo do pomnoževanja genomske DNA *DAPK1*. Pri vseh trojnikih je bila količina mRNA *DAPK1* nedoločljiva (Preglednica X).

Preglednica X: Izpis iz aparata SDS PCR v realnem času za eluate NK, ki jim ni bil dodan encim reverzna transkriptaza med prepisom v cDNA.

Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR System		
Vzorec	Detekcija	Ct
B1 eluat	<i>DAPK 1</i>	Nedoločljivo
B1 eluat	<i>DAPK 1</i>	Nedoločljivo
B1 eluat	<i>DAPK 1</i>	Nedoločljivo
B2 eluat	<i>DAPK 1</i>	Nedoločljivo
B2 eluat	<i>DAPK 1</i>	Nedoločljivo
B2 eluat	<i>DAPK 1</i>	Nedoločljivo

Alikvota, ki smo jima dodali reverzno transkriptazo pri prepisu v cDNA in je prišlo do pomnoževanja med RT-PCR v realnem času, smo nanesti na agarozni gel in z elektroforezo preverili dolžino pomnoževanega fragmenta. Alikvota sta na Sliki 19 označena kot vzorec 1 in 2.



Slika 19: Elektroforeza vzorcev, prepisanih v cDNA z reverzno transkriptazo po PCR v realnem času.

Slika 19 prikazuje agarozni gel po elektroforezi. Nanesen je bil standard s fragmenti znanih dolžin, voda ter dva vzorca z reverzno transkripcijo, kjer so bili dodani vsi reagenti. Na levi strani slike so zapisane dolžine fragmentov v standardu. Lisi vzorcev sta na dolžini med 50 in 100 bp. Vidni lisi potrjujeta, da se oligonukletidni začetniki vežejo na cDNA in se pomnožuje fragment., ki ustreza dolžini, ki jo v specifikaciji reagentov navaja proizvajalec (105 bp). Pri vodi (negativna kontrola) ni lis, kar pomeni, da reagenti niso kontaminirani.

5. RAZPRAVA

5.1. Prva delovna hipoteza

mRNA *DAPK1* se je v raziskavi iz leta 2002 (15) kazala kot obetajoč gen za morebitno povezavo med nivojem mRNA *DAPK1* in stopnjo CAD, saj so v celicah aterosklerotične lehe izmerili skoraj 5-kratno povečanje mRNA *DAPK1* v primerjavi z izražanjem v tkivu zdravih žil. V delovni hipotezi smo predpostavili, da mRNA *DAPK1* iz celic aterosklerotične žilne stene prehaja z različnimi mehanizmi (najpogosteje zaradi apoptoze) v zunajcelični prostor in kri. Predpostavili smo, da je mRNA *DAPK1* prisotna v plazmi bolnikov s CAD in da jo je mogoče izmeriti. Do danes nivo mRNA *DAPK1* v plazmi bolnikov s CAD še ni bil izmerjen.

V sklopu diplomske naloge smo dokazali, da je mRNA *DAPK1* v plazmi prisotna in jo je mogoče izmeriti. Plazemski nivo mRNA *DAPK1* smo izmerili ne samo pri bolnikih s CAD, ampak tudi pri zdravih.

Pri merjenju nivoja mRNA *DAPK1* v plazmi 86 vzorcem smo ugotovili, da je plazemski nivo mRNA *DAPK1* zelo nizek. Ct-ji trojnikov so se močno razlikovali, zato je bilo potrebno posamezne meritve izvajati večkrat. Plazemski nivo smo zanesljivo izmerili pri 69 vzorcih (80 %). Pri 11 vzorcih (13 %) je bil nivo mRNA *DAPK1* prenizek, da bi ga lahko izmerili, pri 6 vzorcih (7 %) pa je bila variabilnost Ct meritev prevelika, da bi lahko izračunali zanesljivo povprečno vrednost. Menimo, da se je mRNA *DAPK1* preveč razgradila, da bi jo lahko izmerili. Če je bila mRNA *DAPK1* preveč razgrajena, se sonda ni mogla vezati na cDNA. Razgradnja mRNA *in vitro* je manj verjetna, saj je bila izolacija pazljivo izvedena v skladu z navodili proizvajalca in po vsaki izolaciji NK je takoj sledil prepis v bolj stabilno cDNA. Težje izključimo razgradnjo *in vivo*.

QIAamp Circulating Nucleic Acid je novejši, od leta 2009 dostopen komplet reagentov za izolacijo NK iz večjih količin plazme. Glede na pretekle izkušnje na Katedri za klinično biokemijo (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani) menimo, da se lahko postopek izolacije NK pomembno izboljša, zato pred nadaljnjo uporabo predlagamo analizo učinkovitosti izolacije in morebitne spremembe protokola. Preveriti bi bilo potrebno ključne korake v izolaciji NK, kot so količina dodanega RNA nosilca, dolžina in pogoji pri proteolizi, način elucije RNA iz kolone in druge.

5.1.1. Vpliv časa proteolize

Po protokolu smo izvajali hidrolizo s proteinazo K 30 min pri 60 °C. Proizvajalec kompleta reagentov za izolacijo NK navaja, da se pri teh pogojih inaktivirajo RNAze in se nato sprostijo NK, vezane na proteine, lipide ali v vezikle (32). Možno je, da pri teh denaturacijskih pogojih razpadejo tudi NK, saj niso vse vezane na proteine ali druge komplekse. V plazmi je prisotna tudi prosta mRNA, ki ni vezana na proteine, lipide ali apoptotična telesca. Ng in sodelavci so v raziskavi ugotovili, da s kliničnim stanjem bolnika bolje korelirala prosta mRNA v plazmi. Merili so plazemski nivo mRNA gliceraldehid-3-fosfatne dehidrogenaze (*GAPDH*) pri zdravih osebah in bolnikih z rakom na jetrih. Pri mRNA *GAPDH* so v plazmi zdravih oseb pred in po filtraciji vzorcev skozi 0,22 µm filter zaznali statistično značilne razlike v koncentraciji (15-krat višja mediana pri nefiltrirani plazmi). Vrednost mediane mRNA *GAPDH* v plazmi bolnikov z rakom na jetrih pa je bila 9,3-krat višja pri nefiltriranem vzorcu kot pri filtriranem. V isti raziskavi so dokazali tudi, da je pri bolnikih povečan plazemski nivo tako mRNA *GAPDH*, vezane na proteine ali druge komplekse kot proste. Iz podatkov sledi, da se v plazmi bolnikov bolj poveča delež proste mRNA *GAPDH* kot mRNA *GAPDH*, vezane v komplekse večje od 0,22 µm (38). Prosta mRNA je labilna in se je pri hidrolizi med izolacijo lahko fragmentirala. Njene razgradnje v času izolacije ne moremo izključiti. Z našim postopkom smo morda prvenstveno določili zunajcelično mRNA *DAPK1*, ki je vezana na proteine ali apoptotična telesca in je zaščitena pred razgradnjo z RNAzami, s klinično sliko pa morda bolje korelira prosta mRNA *DAPK1*.

Pri optimizaciji kompleta reagentov za izolacijo NK istega proizvajalca QIAamp UltraSens Virus Kit se je namreč izkazalo, da je za izboljšavo izkoristka izolacije pomembna dolžina proteolize. Pri 5-minutni proteolizi so bile dosežene najnižje Ct vrednosti, boljša detekcija in nižja deviacija med meritvami (29).

Pred nadaljnjo uporabo postopka izolacije z QIAamp Circulating Nucleic Acid je potrebno preveriti, ali ima čas hidrolize vpliv na izmerjene meritve Ct. Možno je namreč, da zaradi predolge (30 min) proteolize pride tudi do razgradnje NK, ki so zaščitene v obliki apoptotičnih telesc.

Količina proste mRNA *GAPDH*, ki po podatkih v literaturi bolje korelira s kliničnim stanjem bolnika, je bila v deležu od celotne mRNA *GAPDH* majhna (7,4 %) (38), tako da lahko izmerjeni plazemski nivo mRNA *DAPK1* v naši raziskavi jemljemo kot merodajno

količino. Vsekakor pa je pred nadaljnjo analizo potrebna tudi optimizacija postopka merjenja plazemskega nivoja mRNA z RT-PCR v realnem času.

5.1.2. Vpliv DNA v postopkih merjenja mRNA

Ker je pri podobnem postopku merjenja plazemskega nivoja mRNA *DAPK1* v preteklosti na meritev vplivala tudi DNA, smo želeli preveriti, ali je možno, da se hidrolizirajoča sonda, za katero proizvajalec trdi, da se specifično veže le na cDNA *DAPK1*, veže tudi na DNA *DAPK1*. Postopek preverjanja vpliva DNA je opisan v poglavju Metode in v poglavju Rezultati.

Fluorescenčnega signala pri meritvah nivoja mRNA *DAPK1* vzorcem, ki jim nismo dodali encima reverzne transkriptaze, ni bilo možno zaznati, iz česar sklepamo, da se hidrolizirajoča sonda ne veže na DNA, temveč le na cDNA *DAPK1* oziroma, da so naši postopki specifični za mRNA *DAPK1*. Prav tako PCR v realnem času ni dal signala pri negativni kontroli (voda), kar pomeni, da reagenti niso bili kontaminirani. Sklepamo lahko, da DNA ne moti preiskave. Dodatno smo preverili dolžino pomnoževanega oligonukleotidnega fragmenta z elektroforezo. Pri vzorcu, ki je bil prepisan v cDNA z reverzno transkriptazo, opazimo pomnoževan nukleotid dolžine, ki ga v specifikacijah navaja proizvajalec reagentov. Zaključimo lahko, da DNA ne moti našega analiznega postopka, da se sonda specifično veže le na cDNA ter da se pri PCR v realnem času pomnožuje le želeni fragment cDNA *DAPK1*.

5.2. Druga delovna hipoteza

Apoptoza je pomemben mehanizem celične smrti GMC in makrofagov v aterosklerotični lehi. Apoptoza makrofagov je pogosta v območju z veliko znakov sinteze DNA, medtem ko je apoptoza GMC prisotna v regijah brez sinteze ali regeneracije DNA (10). *DAPK1* je serin/treoninska kinaza, ki je regulirana s kalmodulinom in fosforilacijo kinazne domene (13). Je pleotropni encim, ki je vključen tako v mehanizem apoptoze kot avtofagije (14). Avtofagija je običajno pomembna med stradanjem celice, kjer pomaga celici pri regeneraciji oz. odstranitvi poškodovanih organelov. Avtofagija je pogosto prisotna med programirano celično smrtjo, kjer lahko pomaga celici pri regeneraciji in prepreči nadaljnje poškodbe ali pa sama aktivira avtofagično celično smrt (17). Avtofagijo so pred kratkim opazili tudi v aterosklerotični lehi. Njena vloga ni natančno znana. Najverjetneje pomaga celici pri regeneraciji, lahko pa tudi sproži celično smrt (19). Xu in sodelavci so v *in vitro* študiji GMC iz napredovane aterosklerotične lehe obremenili s holesterolom in ugotovili,

PROUČEVANJE NIVOJA mRNA *DAPK1* V PLAZMI BOLNIKOVS CAD

da to aktivira apoptozo in avtofagijo, ki ima vlogo regeneracije. V istih celicah so zaznali zvišan nivo proteina DAPK1 (16). Pri proučevanju genov, ki so pomembni za apoptozo, so izmerili 5-krat višji nivo mRNA *DAPK1* v aterosklerotični žilni steni kot v zdravi žilni steni (15). mRNA je v plazmo sproščena pri apoptozi celice (23).

Apoptoza je torej pomemben vir zunanjceličnih NK v plazmi in je bila zaznana v aterosklerotični lehi, zato je bila druga delovna hipoteza, da imajo bolniki s CAD višji plazemski nivo mRNA *DAPK1* kot zdravi, kar smo s statistično analizo z neparametričnim Mann Whitneyevim U-testom le delno potrdili. Plazemski nivoji mRNA *DAPK1* skupine zdravih in bolnikov s CAD niso kazali statistične razlike ($p > 0,05$). Mejno zvišanje plazemskega nivoja mRNA *DAPK1* ($p = 0,069$) je bilo le pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom (podskupina CAD) v primerjavi s skupino zdravih, zato smo razlike natančneje proučili.

Ateroskleroza je degenerativna vnetna bolezen. Vnetje lahko nespecifično določimo z merjenjem koncentracije C-reaktivnega proteina (CRP) v serumu. Želeli smo preveriti, ali je nespecifični kazalec vnetja protein CRP povezan s plazemskim nivojem mRNA *DAPK1*. Z vidika ateroskleroze je zaželena koncentracija CRP pod 1 mg/L, koncentracija med 1 in 3 mg/L je mejna, nad 3 mg/L pa je tvegana. Podatke o vrednostih CRP smo imeli le za skupino zdravih, zato smo določili mediano (1,25 mg/L) in glede na to razdelili zdrave v dve podskupini. Na ta način smo izključili proces vnetja. Ateroskleroza je namreč vnetni proces, ki se začne že v zgodnjih letih življenja in poteka nesimptomatsko. Možno je, da so med skupino zdravih primeri, ko je ateroskleroza v začetni fazi, ko se znaki in zapleti bolezni klinično še ne kažejo. Proces ateroskleroze bi s koncentracijo CRP najlažje izključili, ker je ta kazalec zelo občutljiv, vendar pa obenem tudi zelo nespecifičen. Koronografija, ki bi pokazala zožitve lumna žil, je premalo občutljiva. Ker je invazivna, je pri zdravih uporaba te metode neupravičena.

Neparametrični Mann Whitneyev test je pri primerjavi rangov skupine zdravih s koncentracijo CRP v plazmi pod ali enako mediani vseh vrednosti pri zdravih in skupine bolnikov z akutnim koronarnim sindromom pokazal, da obstaja značilna razlika med plazemskima nivojema mRNA *DAPK1* ($p = 0,021$, 37 % višji nivo pri bolnikih). Iz tega lahko sklepamo, da bi lahko določanje plazemskega nivoja mRNA *DAPK1* imelo pomen le pri ljudeh, ki jim popolnoma izključimo vnetno dogajanje v organizmu z merjenjem koncentracije nespecifičnega vnetnega kazalca CRP v serumu.

Potrebno se je zavedati, da je CRP nespecifični pokazatelj vnetja in je zato razdelitev zdravih v dve podskupini vprašljiva, saj je lahko povišana koncentracija CRP pri zdravih posledica kakega drugega vnetja. Mi jo povezujemo le z dogajanjem v žilni steni, saj smo pri pridobivanju vzorcev za skupino zdravih imeli izključitvene dejavnike. V raziskavi so sodelovali le tisti, ki so opisali svoj status kot zdravi. Vsi so bili nekadilci. Nihče ni imel sladkorne bolezni, hiperlipidemije ali hipertenzije.

Glede na to, da smo v naši študiji ugotovili, da plazemski nivo mRNA *DAPK1* pri bolnikih v primerjavi z zdravimi ni zvišan, je pa bil v študiji Martineta in sodelavcev (2002) dokazan zvišan nivo mRNA *DAPK1* v GMC aterosklerotične lehe, lahko sklepamo, da v GMC aterosklerotične lehe ne pride do apoptotičnega sproščanja zunajceličnih NK v krvni obtok oz. plazmo. Pri apoptotični celični smrti v aterosklerotični lehi bi prišlo do sproščanja NK v krvni obtok in posledično do zvišanega plazemskega nivoja mRNA *DAPK1*. Tudi Martinet in sodelavci so apoptozo v omenjenih celicah izključili s proučevanjem aktivnosti kaspaze. Kaspaze niso bile aktivirane, kljub visoki koncentraciji proteina DAPK1.

Iz rezultatov naše študije in podatkov iz literature lahko sklepamo, da zvišan nivo mRNA *DAPK1* in zvišana koncentracija proteina DAPK1 vodi GMC celice k avtofagiji. Le ugibamo lahko, ali ima avtofagija protektivni učinek regeneracije GMC ali pa pride do avtofagične smrti in se zunajcelične NK razgradijo v avtolizosomu, zaradi česar ne pride do povečanja mRNA *DAPK1* v plazmi.

Članka, ki bi govoril o sproščanju NK v plazmo pri avtofagični smrti celice, ni. Med avtofagijo se tvori avtolizosom, ki vsebuje številne encime za razgradnjo do osnovnih gradnikov aminokislin, prostih maščobnih kislin in nukleotidov. Avtofagija ima lahko dve vlogi v celici aterosklerotične lehe:

1. lahko vodi v regeneracijo celice in zaustavi celično smrt. Ob tem ne pride do sproščanja NK v plazmo. Poškodovane organele bo v avtolizosomu razgradila v osnovne gradnike.
2. lahko vodi v avtofagično smrt. Celica sama sebe avtofagira. Ob tem se razgradijo tudi NK in zato se plazemski nivo mRNA ne zviša. V prid tej teoriji govori članek Cohena in sodelavcev (11), ki so opazili, da je povišan nivo mRNA *DAPK1* sprožil smrt HeLa celic brez kakršnega koli drugega zunanjšega signala.

mRNA *DAPK1* ima preko zmerne avtofagije pozitiven vpliv na celico, saj jo na nek način varuje v neželenih razmerah. Možno je, da GMC zaradi proliferacije v lehi stradajo, zato s pomočjo avtofagije dobijo nove gradnike za tvorbo proteinov in energije.

PROUČEVANJE NIVOJA mRNA *DAPK1* V PLAZMI BOLNIKOV S CAD

Razlika v plazemskem nivoju mRNA *DAPK1* med bolniki z akutnim koronarnim sindromom in skupino zdravih s koncentracijo CRP pod ali enako mediani vseh vrednosti pri zdravih je lahko posledica dejstva, da pri akutnih stanjih, kot je na primer miokardni infarkt, pride zaradi ishemije do nekroze celice. Zaradi poškodbe celice se NK sprostijo v krvni obtok. Vzorci plazme bolnikov z akutnim koronarnim sindromom so bili odvzeti nekaj dni po miokardnem infarktu, zato bi bilo potrebno za potrditev zgoraj navedenega opraviti dodatne analize na vzorcih plazme, ki so bili odvzeti takoj po akutnem dogodku, saj se NK *in vivo* razgrajujejo in lahko domnevamo, da je zato plazemski nivo mRNA *DAPK1* pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom nižji.

Rezultati laboratorijskih meritev diplomske naloge lahko posredno tudi potrjujejo avtofagijo v makrofagih. Pri njih je namreč težko zaznati proces apoptoze ali avtofagije. Zaradi fagocitozne aktivnosti je s pomočjo elektronskega mikroskopa težko ločiti avtofagocitozne vakuole od fizioloških fagocitov makrofaga. Uporaba protiteles za protein LC3, ki je pokazatelj avtofagije, je težavna zaradi nizkega izražanja LC3 v makrofagih. V *in vitro* študiji, kjer so makrofage obremenili s fitosteroli, so opazili, da pride do avtofagične celične smrti, ki je neodvisna od kaspaz.

Sklepamo lahko, da apoptoza GMC v aterosklerotični lehi ni prisotna v tolikšni meri, da bi lahko vplivala na povišan plazemski nivo mRNA *DAPK1*. Povišana koncentracija DAPK1 v GMC vodi celice v aterosklerotični lehi bolnikov s CAD v avtofagijo. Za odgovor na vprašanje, ali ima avtofagija pozitivno ali negativno vlogo v aterosklerotični lehi, so potrebne nadaljnje raziskave na celičnem nivoju.

6. SKLEP

Objave o obstoju plazemske mRNA *DAPK1* do danes še ni bilo. Z eksperimentalnim delom v diplomski nalogi smo prvič izmerili plazemski nivo mRNA *DAPK1* tako pri bolnikih kot pri zdravih.

Pričakovane razlike v plazemskem nivoju mRNA *DAPK1* med skupinama zdravih posameznikov in bolnikov nismo dokazali. Glede na to, da plazemski nivo mRNA *DAPK1* pri bolnikih s CAD ni bil pomembno zvišan, lahko proces apoptoze v žilni steni izključimo kot prevladujoč mehanizem sproščanja NK v plazmo. Morda lahko tudi utemeljimo v literaturi objavljen zvišan nivo mRNA *DAPK1* in proteina DAPK1 v GMC aterosklerotične lehe (15). Iz podatkov naše raziskave in literaturnega vira lahko sklepamo, da zvišan nivo DAPK1 usmerja celico v avtofagijo. Avtofagija ima lahko protektivni učinek regeneracije GMC in ne vodi v celično smrt ter se tako mRNA ne sprosti v krvni obtok. Drugi učinek pa je lahko avtofagična smrt celice, kjer pride do razgradnje mRNA in se plazemski nivo mRNA *DAPK1* prav tako ne zviša.

Za potrditev našega sklepa so potrebne nadaljnje analize, ki bi potrdile vlogo avtofagije v aterogenezi (zaščitna vloga ali smrt). Tudi za določanje mehanizma propada makrofagov so potrebne nadaljnje analize. Nespremenjen plazemski nivo mRNA *DAPK1* je le posredni dokaz, da apoptoza ni prevladujoč mehanizem propada celic v aterosklerotični lehi.

Statistično pomembna razlika je bila le med skupino bolnikov z akutnim koronarnim sindromom in podskupino zdravih s koncentracijo CRP pod ali enako mediani vrednosti vseh zdravih, vendar je tu potrebno upoštevati, da je CRP nespecifični kazalec vnetja in je razlog za zvišano koncentracijo lahko vnetje, ki ni povezano z aterosklerotičnim razvojem v žilni steni. Glede na to, da so bili mnogi pogosti vzroki za povišano koncentracijo CRP (kajenje, sladkorna bolezen, hipertenzija, hiperlipidemija, okužbe) izključitveni dejavnik pri naboru skupine zdravih, lahko vseeno razlagamo, da je ta razlika pomembna in je mogoče dokaz, da pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom pride do sproščanja nukleinskih kislin v krvni obtok. Možno je, da zaradi ishemičnega miokardnega infarkta pride do nekroze, zaradi katere se zviša plazemski nivo mRNA *DAPK1*.

Zaključimo lahko, da je neinvazivna metoda merjenja plazemskega nivoja mRNA *DAPK1* neprimerna za *in vivo* določanje stopnje ali spremljanje koronarne ateroskleroze, bi pa

PROUČEVANJE NIVOJA mRNA *DAPK1* V PLAZMI BOLNIKOV S CAD

morda lahko z enakim pristopom izolacije in kvantifikacije mRNA analizirali druge gene, ki bi bolje korelirali s stopnjo aterosklerotične bolezni.

Glede nadaljnje uporabe metode merjenja mRNA v plazmi predlagamo predvsem optimizacijo metode izolacije NK in analizo večje količine plazme, ki bi zagotovo dale zanesljivejše meritve.

VIRI IN LITERATURA

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
2. http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=46&pi=5&_5_id=53&_5_PageIndex=1&_5_groupId=185&_5_newsCategory=&_5_action=ShowNewsFull&pl=46-5.0.
3. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D. Interna medicina. Littera picta, Ljubljana, 2005; 736-761.
4. http://www.drmed.org/javne_datoteke/novice/datoteke/8241-8.-Fajdigovi-dnevi-zbornik.pdf
5. Ross R. Mechanism of Disease: Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. N Engl J Med 1999; 340; 2: 115-126.
6. Šuput D, Bunc M, Pavlin R. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. Littera picta, Ljubljana, 2005; 235-249.
7. Christopher KG, Joseph LW. Atheroscl The Road Ahead Cell 2001; 104: 503-516.
8. Vozelj M. Temelji imunologije. DZS, Ljubljana 2001; 239-338.
9. Thygesen KA, Alpert JS. The Definitions of Acute Coronary Syndrome, Myocardial Infarction, and Unstable Angina. Curr Cardiol Rep 2001; 3: 268-272.
10. Kockx MN, Herman AG. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? Cardiovasc Res 2000; 45: 736-746.
11. Cohen O, Feinstein E, Kimchi A. DAP-kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. The EMBO Journal 1997; 16 (5): 998-1008.
12. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DAPK1&search=dapk>
13. Lynch TH, Ferrara K, Weisenburger D, Sanger W, Lynch JF, Thome S. Genetic Counseling for DAPK1 Mutation in a Chronic Lymphocytic Leukemia Family. Cancer Genet Cytogenet 2008; 186 (2): 95-102.
14. Maiuri MC, Tasdemir E, Criollo A, Morselli E, Vicencio JM, Carnuccio R, Kroemer G. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. Cell Death Diff 2009; 16, 87-93.
15. Martinet W, Schrijvers DM, De Meyer GR, Thielemans J, Knaapen MW, Herman AG, Kockx MM. Gene Expression Profiling of Apoptosis-Related Genes in Human Atherosclerosis: Upregulation of Death-Associated Protein Kinase. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22: 2023-2029.

16. Xu K, Yang Y, Yan M, Zhan J, Fu X, Zheng X. Autophagy plays a protective role in free cholesterol overloading induced smooth muscle cells death. *J Biol Chem* 2010; 51: 2581-2590.
17. Bialik S, Kimchi A. Lethal weapons: DAP-kinase, autophagy and cell death DAP-kinase regulates autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 22: 1–7.
18. http://www.weizmann.ac.il/molgen/members/Kimchi/new_pages/research.html
19. Martinet W, De Meyer GRY. Autophagy in Atherosclerosis. *Curr Atherosclerosis Rep* 2008; 10: 216–223.
20. Martinet W, De Meyer GRY. Autophagy in Atherosclerosis. A Cell Survival and Death Phenomenon With Therapeutic Potential. *Circulation Res* 2009; 104: 304-317.
21. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Diff* 2009; 16: 966–975.
22. Černe D. Sodobna uporaba analize zunajceličnih nukleinskih kislin v laboratorijski medicini. *Farm vestn* 2010; 61: 144-148.
23. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, Rossier A, Chen XQ, Anker P. The Origin and Mechanism of Circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 906: 161-168.
24. Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleotides Nucleic Ac* 2004; 23: 879-883.
25. Tong YK, Lo YMD. Diagnostic developments involving cell free (circulating) nucleic acids. *Clin Chim Acta* 2006; 363: 187-196.
26. Wong BCK, Lo YMD. Cell-free DNA and RNA in plasma as new tools for molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2003; 3 (6): 785-797.
27. Hefnawy TE, Raja R, Kelly L, Bigbee WL, Kirkwood JM, Luketich JD, Godfrey TE. Characterization of Amplifiable, Circulating RNA in Plasma and Its Potential as a Tool for Cancer Diagnostics. *Clin Chem* 2004; 50: 564-573
28. Destouni A, Vrettou C, Antonatos D, Chouliaras G, Traeget-Synodinos J, Patsilikanos S, Kitisiou-Tzelei S, Tsigas S, Kanavaskis E. Cell-free DNA levels in acute myocardial infarction patients during hospitalization. *Acta Cardiol* 2009; 64: 51-57.
29. Černe D, Štern I, Kranjec I, Marc J. Optimisation of methods for quantifying plasma mRNA from genes responsible for coronary artery plaque development and destabilization. *Med Glas Ljek Komore* 2011; 8 (1): 88-94.

30. Reiner TH, Lam NYL, Man CY, Chiu RWK, Woo KS, Lo YMD. Plasma β -globin DNA as a prognostic marker in chest pain patients. Clin Chem Acta 2006; 368: 110-113.
31. Wood D, De Backer G, Faergeman O, Graham I, Mancina G, Pyörälä K. Prevention of coronary heart disease in clinical practise: recommendation of the Second Joint Task Force of European and other Societies on Coronary Prevention. Atheroscl 1998; 140: 199-270.
32. <http://www.qiagen.com/literature/default.aspx?Term=&Language=EN&LiteratureType=1&ProductCategory=232&r=1281> (Povezava za QIAamp® Circulating Nucleic Acid Handbook, 2009)
33. <http://www.nem.wur.nl/UK/education/Other+courses+1/Molecular+Identification/>
34. Dovč-Drnovsek T, Emeršič B, Rozman P, Černe D, Lukač-Bajalo J. Optimization of Purification of Human Cell-Free mRNA from Plasma. Ann NY Acad Sci 2008; 1137: 125-129.
35. Arko B. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. Farm Vestn 2004; 55: 215-220.
36. http://www.iba-go.com/naps/naps_p_rg_real.html
37. Pfaffl WM. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29: 2002-2007.
38. Ng K, Tsui NBY, Lam YLN, Chiu WKR, Yu CHS, Wong SCC, Lo SFE, Rainer HT, Johndon JP, Lo YMD. Presence of Filterable and Nonfilterable mRNA in the Plasma of Patients and Healthy Individuals. Clin Chem 2002; 48 (8): 1212-1217.

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Adhezija monocita in diferenciacija makrofaga v začetni fazi razvoja ateroskleroze</i>	3
<i>Slika 2: Proliferacija GMC in nadaljnji razvoj ateroskleroze do fibrozne lehe</i>	4
<i>Slika 3: Shematična predstavitev proteina DAPK1</i>	5
<i>Slika 4: Lokacija DAPK1 na 9. kromosomu</i>	5
<i>Slika 5: Mreža delovanja DAPK1</i>	6
<i>Slika 6: Zvečano izražanje DAPK1 in nivoja mRNA DAPK1 in Bax v GMC po obremenitvi z LDL</i>	8
<i>Slika 7: Shematični prikaz učinkov avtofagije v aterosklerotični lehi</i>	10
<i>Slika 8: Model regulacije avtofagije preko DAPK1</i>	11
<i>Slika 9: Prikaz regulatorjev, ki imajo vpliv na apoptozo in avtofagijo</i>	12
<i>Slika 10: Shematični prikaz izolacije zunajceličnih NK</i>	21
<i>Slika 11: Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času</i>	22
<i>Slika 12: Princip detekcije produktov pri PCR v realnem času s hidrolizirajočo sondo Taqman</i>	24
<i>Slika 13: Predstavitev porazdelitve starosti vzorca glede na bolezensko stanje</i>	28
<i>Slika 14: Predstavitev deleža izmerjenih nivojev mRNA DAPK1v plazmi</i>	29
<i>Slika 15: Plazemski nivo mRNA DAPK1 standardiziran na nivo mRNA ACTB po skupinah</i>	32
<i>Slika 16: Prikaz porazdelitve plazemskega nivoja mRNA DAPK1 po rangih v skupini zdravih in skupini bolnikov z akutnim koronarnim sindromom</i>	34
<i>Slika 17: Prikaz porazdelitve plazemskega nivoja mRNA DAPK1 v skupini zdravih s koncentracijo CRP pod ali enako mediani vseh vrednosti pri zdravih in skupino bolnikov z akutnim koronarnim sindromom</i>	35
<i>Slika 18: Prikaz porazdelitve plazemskega nivoja mRNA DAPK1 v skupini zdravih s koncentracijo CRP v plazmi nad mediano vseh vrednosti pri zdravih in skupino bolnikov z akutnim koronarnim sindromom</i>	35
<i>Slika 19: Elektroforeza vzorcev, prepisanih v cDNA z reverzno transkriptazo po PCR v realnem času</i>	37

KAZALO PREGLEDNIC

<i>Preglednica I: Klinične značilnosti vzorca</i>	18
<i>Preglednica II: 10X PBS pufer</i>	19
<i>Preglednica III: Količine reagentov za reverzno transkripcijo</i>	22
<i>Preglednica IV: Količine reagentov za eno reakcijo RT-PCR v realnem času</i>	25
<i>Preglednica V: Predstavitev podatkov o spolu in starosti glede na bolezensko stanje</i>	28
<i>Preglednica VI: Povprečni Ct in izračun relativnega plazemskega nivoja mRNA DAPK</i>	29
<i>Preglednica VII: Vrednosti mediane plazemskega nivoja mRNA DAPK1, 25. in 75. percentil ter najnižje in najvišje vrednosti za posamezne skupine</i>	32
<i>Preglednica VIII: Test normalnosti distribucije plazemskega nivoja mRNA DAPK1</i>	33
<i>Preglednica IX: Predstavitev rezultatov neparametričnega Mann Whitneyevega U-testa</i>	33
<i>Preglednica X: Izpis iz aparata SDS PCR v realnem času za eluate NK, ki jim ni bil dodan encim reverzna transkriptaza med prepisom v cDNA</i>	36