



*Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Μπαλατσό Νικόλαο.*

#### ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

- Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης, Καθηγητής Πνευμονολογίας  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Διευθυντής Πνευμονολογικής Κλινικής,  
Πρύτανης Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Θεόδωρος Κυρόπουλος, Βιοχημικός, Διδάκτωρ Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας
- Νικόλαος Μπαλατσός, Λέκτορας του τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

#### ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

- Νικόλαος Μπαλατσός, Λέκτορας του τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## *Ευχαριστίες,*

*Όλους όσους με εμπιστεύτηκαν για την ανάθεση αυτής της εργασίας. Ευχαριστώ τον κύριο Μπαλατσό για το πρωτότυπο του θέματος, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την διεκπεραίωση των πειραμάτων, όπως επίσης για την πληθώρα γνώσεων που μου προσέφερε και για τις πολύτιμες συμβουλές που ήταν καθοριστικές για την επίτευξη του στόχου μας. Ευχαριστώ τον κύριο Σταθόπουλο που με δέχτηκε στο εργαστήριο του και για την ενθάρρυνση που δέχτηκα για την ολοκλήρωση της εργασίας. Επίσης οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου Λειτουργικής Βιοχημείας με τους οποίους η συνεργασία ήταν παραπάνω από ευχάριστη και εποικοδομητική, στα μέλη του εργαστηρίου μοριακής μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας όπως επίσης και στα μέλη του εργαστηρίου Ιολογίας και Μικροβιολογίας του τμήματος. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου και στους φίλους μου για την μεγάλη και ανεκτίμητη υποστήριξη τους.*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	6
Νατριουρητικά Πεπτίδια (NPs).....	6
BNP –Εγκεφαλικό Νατριουρητικό Πεπτίδιο .....	9
ΣΚΟΠΟΣ.....	14
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	15
ΥΛΙΚΑ.....	15
ΜΕΘΟΔΟΙ .....	21
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	30
Ανοσοαποτύπωση σε δείγματα ορών από σηπτικούς ασθενείς.....	30
ECLIA- Ανοσολογική Μέθοδος Ηλεκτροχημειοφωταύγειας.....	31
Ανίχνευση proBNP σε καρκινικά κύτταρα Her2.....	34
Ανοσοαποτύπωση ύστερα από διαμόλυνση της καρκινικής σειράς Her2.....	35
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	39

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Το εγκεφαλικό νατριουρητικό πεπτιδίο (BNP) ανήκει στην οικογένεια των νατριουρητικών πεπτιδίων, που σχετίζονται με την καρδιακή ομοιόσταση. Το BNP (μήκους 32 αμινοξέων και με χρόνο ημιζωής 23 λεπτά) απελευθερώνεται από τον πρόδρομο του proBNP(108 αμινοξέων), κατά τη διάρκεια της διαδικασίας έκκρισης, μαζί με το μη ενεργό N-terminal proBNP (μήκους 76 αμινοξέων και με χρόνο ημιζωής 1-2h).

Οι συγκεντρώσεις των μορίων αυτών στο πλάσμα εξαρτάται από το ρυθμό αποβολής από το πλάσμα. Το βιολογικά ενεργό πεπτιδίο αποβάλλεται από το πλάσμα μέσω διαφορετικών ενζυμικά καταλυόμενων μονοπατιών και μέσω της σπειραματικής διήθησης. Αντιθέτως, το βιολογικά μη ενεργό μόριο, NT-proBNP, πιθανότατα αποβάλλεται μόνο μέσω σπειραματικής διήθησης. Παράγοντες που επηρεάζουν τις ποικίλες διαδικασίες αποβολής επηρεάζουν ως εκ τούτου τις συγκεντρώσεις των πεπτιδίων στο πλάσμα και τις διαγνωστικές τους ιδιότητες. Επιπλέον, η σταθερότητα στα δείγματα αίματος διαφέρει, γι' αυτό προκύπτει διαφορετική διαγνωστική χρησιμότητα των δύο μορίων. Πρόσφατα το NT-proBNP αναγνωρίστηκε ως διαγνωστικός δείκτης στη πρωτοβάθμια υγεία για διάφορες παθήσεις της καρδιάς και των πνευμόνων.

Στην παρούσα μελέτη εξετάζεται η ρύθμιση έκφρασης του εγκεφαλικού νατριουρητικού πεπτιδίου σε δείγματα ορού ασθενών με σήψη μέσω ανοσοαποτύπωσης "WESTERN BLOT" και ανοσοηλεκτροχημειοφωταύγειας "ECLIA" και επίσης εξετάζεται η παρουσία του προπεπτιδίου NT-proBNP σε καρκινικά κύτταρα Hep 2. Κατόπιν ανίχνευσης του NT-proBNP στα καρκινικά κύτταρα, συγκρίνονται τα επίπεδα έκφρασης του προπεπτιδίου έπειτα από αποσιώπηση των αποαδενυλασών CNOT7, και PARN με ανοσοαποτύπωση "WESTERN BLOT".

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1.Νατριουρητικά Πεπτίδια (NPs)

### 1.1.1.Τύποι NPs

Τα καρδιακά μυοκύτταρα παράγουν και εκκρίνουν μια οικογένεια μικρών πεπτιδίων, τα νατριουρητικά πεπτίδια (NPs), τα οποία έχουν διουρητικές, νατριουρητικές και αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες(*Y.H. Park et al.2006*).

Τα νατριουρητικά πεπτίδια ενεργοποιούν ειδικούς υποδοχείς της Γουανυλικής Κυκλάσης (GC) και ρυθμίζουν την σύνθεση του cGMP. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί τα εξής:

- ANP (Atrial Natriuretic Peptide)
- BNP ( Brain Natriuretic Peptide)
- C-type Natriuretic Peptide
- Νεφρικό Νατριουρητικό Πεπτιδίο (ANP 95-126), με την ονομασία Urodilatin, που σχετίζεται δομικά με την οικογένεια των ANP/BNP, δεν εκκρίνεται από τον καρδιακό ιστό αλλά από τους νεφρούς και το ενδοθήλιο.
- Dendroaspis Natriuretic Peptide, πρόσφατα αναγνωρισμένο με δομή και λειτουργία όμοια με αυτή των NPs.

### 1.1.2.Ρόλος NPs

Τα νατριουρητικά πεπτίδια (NPs) είναι οικογένεια σχετικών ορμονών που διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην καρδιαγγειακή ομοιόσταση. Έχουν αποδειχθεί ως σημαντικοί κλινικοί δείκτες στην καρδιακή ανεπάρκεια (*Aldo Clerico, 2004*).

Πρόσφατα στοιχεία έχουν προσδώσει σημαντικό ρόλο σε αυτούς τους δείκτες στη διάγνωση της καρδιακής ανεπάρκειας σε ασθενείς με ανεξήγητη δύσπνοια.

Άλλες κλινικές χρήσεις των νατριουρητικών πεπτιδίων, όπως η ανίχνευση ασυμπτωματικής κοιλιακής δυσλειτουργίας, η πρόγνωση ή η τιτλοδότηση για τη φαρμακευτική θεραπεία, είναι υπό έρευνα αλλά ακόμα δεν έχουν επιβεβαιωθεί για κλινική χρήση.

### 1.1.3. Δράση των NPs

Η νατριουρητική τους δράση οφείλεται σε δύο λόγους:

1. Προκαλούν διάταση του προσαγωγού αρτηριδίου και μικρού βαθμού σύσπαση του απαγωγού με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης εξ αιτίας της αύξησης της πίεσης διήθησης στο νεφρικό σπείραμα. Οι αιμοδυναμικές μεταβολές που προκαλούνται έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του κλάσματος διήθησης (FF) αλλά και την αύξηση της προσφοράς υγρού στον άπρω νεφρώνα.

2. Επιδρούν στο αθροιστικό σωληνάριο και συγκεκριμένα στην έσω μυελώδη μοίρα (Inner Medullary Collecting Duct) και προκαλούν αναστολή της λειτουργίας ενός διαύλου μεταφοράς νατρίου, στην επιφάνεια των κυττάρων, ο οποίος είναι ευαίσθητος στην αμιλορίδη. Η αναστολή αυτή επιτελείται είτε δια μέσου ενεργοποίησης της Γουανικής Κυκλάσης και παραγωγής κυκλικής Μονοφωσφορικής Γουανοσίνης (cGMP) είτε δια μέσου των πρωτεϊνών G34.

Τα νατριουρητικά πεπτίδια προκαλούν ευεργετική επίδραση στην καρδιά και την συστηματική κυκλοφορία δεδομένου ότι δρουν ως ανταγωνιστές του συστήματος Ρενίνης - Αγγειοτενσίνης - Αλδοστερόνης και προκαλούν περιφερική αγγειοδιαστολή, αυξάνοντας την δραστηριότητα του

παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος και μειώνοντας την δραστηριότητα του συμπαθητικού.

Παρά το γεγονός ότι η εν λόγω δραστηριότητα τους προσδίδει τον χαρακτήρα των παραγόντων άμυνας του οργανισμού, κατά των βλαπτικών επιδράσεων των νευροορμονικών μηχανισμών που κινητοποιούνται επί καρδιακής ανεπάρκειας, τα νατριουρητικά πεπτίδια ευοδώνουν την δημιουργία οιδήματος δεδομένου ότι αυξάνουν την διαβατότητα των τριχοειδών στις πρωτεΐνες του πλάσματος.

Η συγκέντρωση των NPs στην κυκλοφορία εξαρτάται από:

Φυσιολογικούς παράγοντες όπως:

- οι κίρκαδικές μεταβολές
- η ηλικία
- το φύλο
- η άσκηση
- η στάση του σώματος
- η απορρόφηση νερού
- διατροφικές συνήθειες (ειδικά η πρόσληψη νατρίου)

Κλινικές συνθήκες και φάρμακα

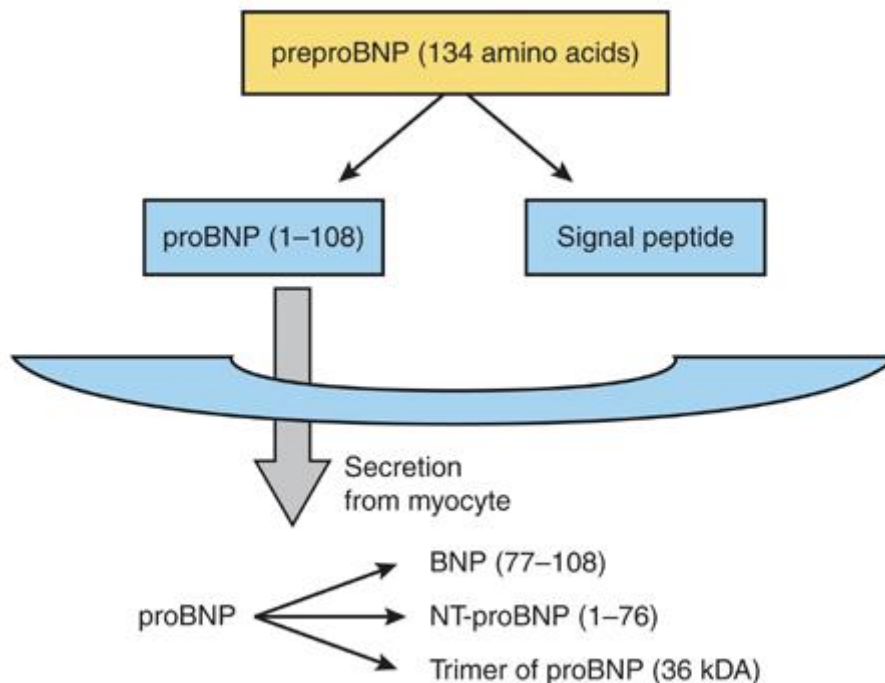
- Κορτικοστεροειδή
- φυλετικές ορμόνες
- ορμόνες του θηροειδή
- διουρητικά

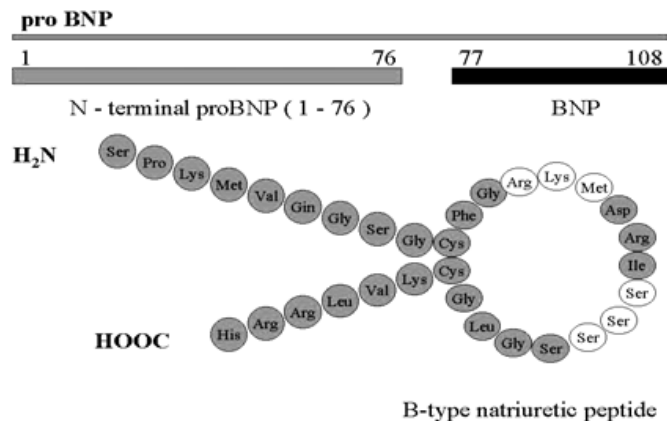


## 1.2.BNP -Εγκεφαλικό Νατριουρητικό Πεπτίδιο

### 1.2.1.Μοριακή σύνθεση BNP

Το εγκεφαλικό νατριουρητικό πεπτίδιο (BNP) είναι μια καρδιακή νευροορμόνη που συντίθεται, αποθηκεύεται και απελευθερώνεται κυρίως από το κοιλιακό μυοκάρδιο, σε απάντηση στην αύξηση του όγκου και στην αυξημένη πίεση. Απελευθερώνεται ως preproBNP (134 αμινοξέων) και κατόπιν διασπάται σε proBNP(108 αμινοξέων) και ενός μικρού πεπτιδίου 26 αμινοξέων. Το pro-BNP στη συνέχεια διασπάται στο φυσιολογικά ενεργό BNP (32 αμινοξέα) και ένα N-τερματικό κλάσμα, αποκαλούμενο ως N-Terminal pro-BNP (76 αμινοξέα).. Το NPPB γονίδιο βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 1p36.2 (*Hans Kemperman,2004*).





Αλληλουχία Αμινοξέων	H - Ser - Pro - Lys - Met - Val - Gln - Gly - Ser - Gly - Cys - Phe - Gly - Arg - Lys - Met - Asp - Arg - Ile - Ser - Ser - Ser - Ser - Gly - Leu - Gly - Cys - Lys - Val - Leu - Arg - Arg - His - OH Περιέχει έναν δακτύλιο 17 αμινοξέων (Δισουλφιδική γέφυρα: 10 - 26)
Μοριακό Βάρος	3464.1

### 1.2.2.Δομή του BNP

Η κεντρική δομή του BNP, η οποία είναι η κοινή δομή των νατριουρητικών πεπτιδίων και αποτελείται από ένα 17μελή δισουλφιδικό δακτύλιο με μια υψηλά συντηρημένη εσωτερική αλληλουχία -FGXXXDRIGXXSGL-, παίζει ουσιαστικό ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης όπως και στις νατριουρητικές, διουρητικές και αγγειοδιαστολικές επιδράσεις του πεπτιδίου (*Tian-Nan Wang et al,2007*). Επίσης παίζει ρόλο στην αναστολή της έκκρισης ρενίνης-αγγειοτενσίνης, αλδοστερόνης και τη

δράσης του συμπαθητικού. Οι επιδράσεις του προκαλούνται από την επιλεκτική πρόσδεσή του στους υποδοχείς τύπου NPR-A (επίσης γνωστοί ως GC-A) οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι σε C-terminal GC κυτταροπλασματικές καταλυτικές περιοχές και μεταδίδουν το σήμα τους μέσω του κυκλικού GMP. Ο χρόνος ημιζωής του BNP είναι 15-20 λεπτά, ενώ το μη ενεργό NT-proBNP έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής (60–120 minutes), το οποίο είναι σχετικό με την χρησιμότητα του σε διαγνωστικές εξετάσεις (*David Williams, 2004*).

### 1.2.3.Κλινική χρησιμότητα

Η έκφραση του NPPB γονιδίου αυξάνεται δραματικά ως απάντηση σε υπερτροφικά ερεθίσματα και μάλιστα είναι άμεσα ανάλογη με την κοιλιακή διαστολή. Εκτός από καινοφανής καρδιακή ορμόνη, το BNP εμπλέκεται και στην ανταλλαγή νατρίου και νερού κατά μήκος του εντέρου (*Dr S.Masson, 2006*)

Πολυάριθμες κλινικές δοκιμές υποδεικνύουν την πιθανή κλινική χρησιμότητα του BNP πλάσματος στους εξής τομείς:

1. Διάγνωση της δύσπνοιας και της συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας,
2. Ανίχνευση της αριστερής κοιλιακής συστολικής και διαστολικής δυσλειτουργίας,
3. Πρόγνωση των ασθενών με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και οξεία στεφανιαία σύνδρομα και
4. Παρακολούθηση της θεραπείας για ασθενείς με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια.

Πολλαπλές μελέτες αποδεικνύουν την αξία του BNP για τη διευκόλυνση της διάγνωσης της συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας σε ασθενείς που παρουσιάζουν δύσπνοια. Οι Davis et al (*Davis et al, 1994*) μέτρησαν τα επίπεδα ANP και BNP σε 52 ασθενείς που παρουσίαζαν οξεία δύσπνοια.

Βρήκαν ότι οι συγκεντρώσεις BNP πλάσματος κατά την εισαγωγή αντικατόπτριζαν με μεγαλύτερη ακρίβεια την τελική διάγνωση απ' ότι τα επίπεδα κλάσματος εξώθησης (EF) ή οι συγκεντρώσεις ANP πλάσματος. Οι Morrison et al (*Morrison et al, 2002*) κατέδειξαν επίσης ότι η ταχεία δοκιμασία BNP θα μπορούσε να βοηθήσει στη διαφοροποίηση της πνευμονικής από την καρδιακή αιτιολογία της δύσπνοιας.

Επιπλέον, η επιτροπή Task Force of the European Society of Cardiology for the Diagnosis and Treatment of Chronic HF (*Remme WJ, 2001*) συμπεριέλαβε τη χρήση της δοκιμασίας νατριουρητικού πεπτιδίου (π.χ. BNP) μαζί με την ηλεκτροκαρδιογραφία και τις ακτινογραφίες θώρακος στις οδηγίες της για τη διάγνωση ή τον αποκλεισμό της καρδιακής ανεπάρκειας (HF).

Το BNP καταδείχθηκε επίσης ότι προβλέπει τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα σε άλλες καρδιαγγειακές καταστάσεις, όπως οξεία στεφανιαία σύνδρομο και οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομο με αυξημένα επίπεδα BNP έχουν υψηλότερα ποσοστά καρδιακών επιπλοκών και υψηλότερη θνησιμότητα μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Πολυάριθμες κλινικές δοκιμές έχουν υποδείξει την κλινική χρησιμότητα του NT-proBNP ως δείκτη διάγνωσης ασθενών με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και αριστερή κοιλιακή συστολική δυσλειτουργία. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα επίπεδα του συγκεκριμένου πεπτιδίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη στεφανιαίων συνδρόμων και σε φαινομενικά υγιείς πληθυσμούς.

Οι συγκεντρώσεις του NT-proBNP στο πλάσμα αυξάνονται ως αποτέλεσμα συστολικής δυσλειτουργίας, ηλικίας, νεφρικής δυσλειτουργίας, καρδιακής ισχαιμίας και διεύρυνσης (enlargement), και από ορισμένα φάρμακα. Οι τιμές είναι υψηλές σε περιπτώσεις διαστολικής δυσλειτουργίας με ψευδο-φυσιολογικά πρότυπα, αλλά όχι σε ασθενείς με ανωμαλίες χαλάρωσης του καρδιακού μυός.

#### 1.2.4.BNP και σήψη

Πειράματα έχουν δείξει ότι η ενδοτοξίνη καθώς και κάποιες κυτοκίνες ρυθμίζουν την μεταγραφή του γονιδίου NPPB, επομένως ο βαθμός της φλεγμονώδους απάντησης θα μπορούσε να συμβάλλει, σε ένα ποσοστό, στα δραματικά υψηλά επίπεδα του NT-proBNP που έχουν καταγραφεί κατά τη διάρκεια σηπτικού σοκ. Σε σηπτικούς ασθενείς οι τιμές του BNP έχουν άμεσα συσχετιστεί με τη θνησιμότητα (*Antoine Roch,2007*).

#### 1.2.5.BNP και καρκίνος

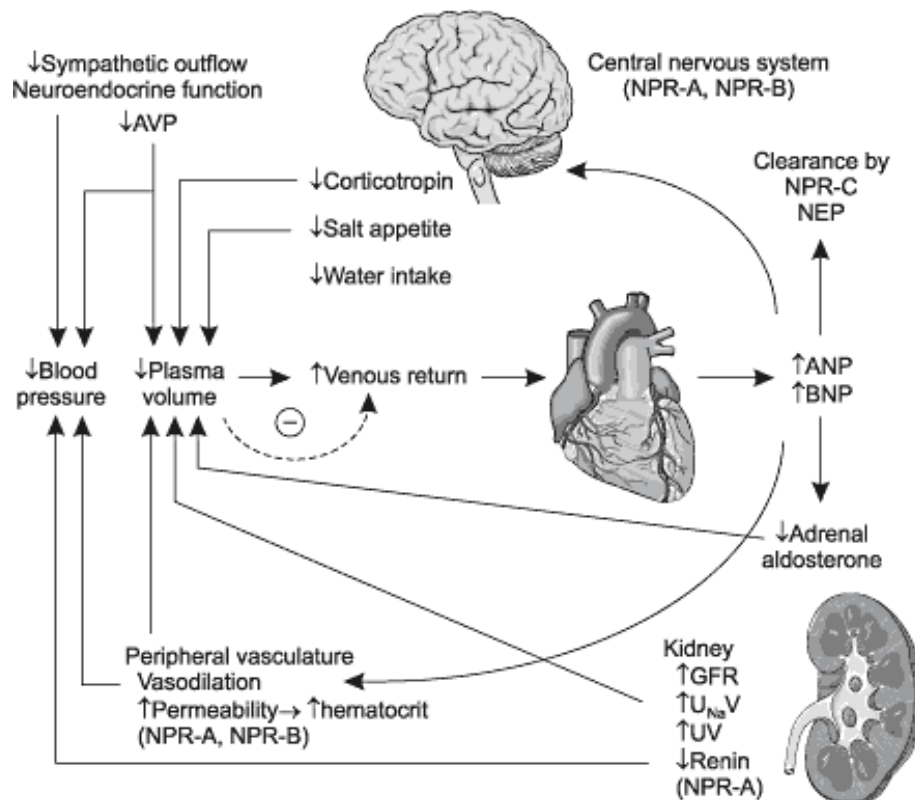
Σε ασθενείς με πολλαπλά συνοδά νοσήματα και σημαντικά αυξημένες τιμές του BNP, δεν έχει βρεθεί κάποια αξιοσημείωτη σχέση με την κλινική περίπτωση της αύξησης καρκινικού όγκου.

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Το εγκεφαλικό νατριουρητικό πεπτιδίο, BNP, έγινε πρόσφατα γνωστό για τη διαγνωστική του χρησιμότητα σε περιπτώσεις καρδιακής ανεπάρκειας. Εντούτοις, η μοριακή ρύθμιση της έκφρασής του έχει μελετηθεί ελάχιστα.

Στη παρούσα εργασία εξετάζεται η ρύθμιση της έκφρασης του εγκεφαλικού νατριουρητικού πεπτιδίου και του πρόδρομου μορίου του σε σηπτικούς ασθενείς και θα επιχειρηθεί μια πρώτη προσέγγιση για την κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασής του.

Για το λόγο αυτό, θα μελετήσουμε την επίδραση δύο αποαδενυλασών (CNOT7 και PARN), ενζύμων που εμπλέκονται σε μηχανισμούς ρύθμισης, στα επίπεδα έκφρασης του Pro-BNP. Η επίδραση θα μελετηθεί μέσω της αποσιώπησης των ενζύμων αυτών με κατάλληλα shRNAs σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα Hep2. Με ανοσοαποτύπωση θα ελεγχθεί σε επίπεδο πρωτεϊνών κατ'αρχήν η επιτυχία της αποσιώπησης και τα επίπεδα έκφρασης των εξεταζόμενων παραγόντων, μεταξύ αυτών και το Pro-BNP σε εκχυλίσματα κυττάρων αγρίου τύπου και κυττάρων διαμολυσμένων με τα shRNAs.



### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

##### **1. RUNNING BUFFER 10X (500ml)**

72gr γλυκίνη 1,92M M.B= 75,04

15gr TRIS 0,25M M.B=121,1

5gr SDS 0,035M M.B=288,4

##### **2. PONCEAU RED**

Δύο τρόποι παρασκευής:

1) 0,1% ponceau w/v σε 5% οξικό οξύ

2) 2% ponceau w/v σε 30% TCA και 30% sulfosalicylic acid

##### **3. 30% Acrylamide-Bis (100ml)**

30gr acrylamide

1gr bis

100ml dH<sub>2</sub>O

##### **4. LYSIS BUFFER**

600Mm KCl

20mM Tris-HCl pH=7,8

20% γλυκερόλη

4% αναστολείς πρωτεασών

## **5. TRANSFER BUFFER**

Tris 48mM

Γλυκίνη 39mM

SDS 1,3mM

Μεθανόλη 20%

## **6. PBS 1x**

137mM NaCl,

2.7mM KCl,

4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

## **7. ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟ ΔΙΑΥΜΑ**

10% DMSO

20% FBS

MEM

## **8. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

MEM (5 ή 10% FBS, 1% Antibiotic-antimycotic)



## **9. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΙΛΑΜΙΔΙΟΥ**

- 30% bis/acrylamide (29:1 / acrylamide:bis-acrylamide) σε ddH<sub>2</sub>O
- 10% SDS
- Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl pH 8.8 1M
- Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl pH 6.8 1M
- Ρυθμιστικό Διάλυμα 10x pH 8.3: Tris-base 1,5%, Γλυκίνη 7,2%, SDS 0,5%
- Loading Buffer (1M Tris pH 6.8, 10% glycerol, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% bromophenol blue)

## **10. ΓΙΑ ΒΑΦΗ ΤΟΥ GEL**

### **1. Coomassie Brilliant Blue 0,01%**

- 40% μεθανόλη
- 10% οξικό οξύ

### **2. Destaining Buffer**

- 30% μεθανόλη
- 10% οξικό οξύ

## **11. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ TRANSFER GEL ΠΟΛΥΑΚΡΙΛΑΜΙΔΙΟΥ ΣΕ PVDF ΜΕΜΒΡΑΝΗ**

Transfer Buffer

- Tris 48mM,
- Glycine 39mM, SDS 1.3mM, Methanol 20%)

## 12. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ DETECTION

- Blotto Buffer (5% Skim Milk, 0,1 % Tween 20 σε PBS)
- PBS-T (0,1% Tween 20 σε PBS)
- ECL : Solution A και B Amersham
- ECL PLUS : Solution A και B Amersham
- Developer Solution      Kodak
- Fixer Solution              Kodak

## 13. TRANSFECTION REAGENTS

Lipofectamine™ 2000      Invitrogen

### 3.1.1.XHMIKA

Acrylamide	Sigma
Antibiotic-Antimycotic	Biosera
APS (Ammonium Persulfate)	Sigma
BCIP/NBT Alkaline Phosphatase System	KPL
Bioquant Protein	Merck
Bis-acrylamide	Sigma
Bromophenol Blue	Research Organics
FBS	Gibco

Full Range Rainbow MW Markers	Amersham
HCl	Merck
KCl	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
MEM	Biosera
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
NaCl	Panreac
NaOH	Merck
Ponceau Red	Sigma
SDS	Sigma
Skimmed Milk	Scharlau
TCA	Fluka
Temed	Research Organics
Trypsin-EDTA 5% 10x	Gibco
Tween 20	Euroclone
Αιθανόλη	Merck
Ακετόνη	Merck
Αμμωνία	Merck
Γλυκερόλη	Panreac
Γλυκίνη	AppliChem
Ισοπροπανόλη	Scharlau
Μεθανόλη	Merck

### 3.1.2. ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ

Hep2

### 3.1.3. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Antibiotic-antimycotic 100x	Biosera
FBS	Biosera
MEM	Biosera
Puromycin 2HCl	Biosera
Electroforesis	Serva

### 3.1.4. ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ, ENZYMA ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Anti-BNP32	PHOENIX PHARMACEUTICALS,INC.
Anti-proBNP	PHOENIX PHARMACEUTICALS,INC.
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Chemicon
Protease Inhibitors	Roche
shRNA bacterial glycerol stock	Sigma

### 3.1.5.ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ “ECLIA”

Kit αντιδραστηρίων proBNP Elecsys, αριθμός καταλόγου 03121640-100 προσδιορισμοί

M Μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη (*διαφανές πώμα*), 1 φιαλίδιο, 6,5 mL

R1 Αντίσωμα anti-NT-proBNP-βιοτίνη (*γκρι πώμα*), 1 φιαλίδιο, 9mL

P2 Αντίσωμα anti-NT-proBNP-Ru(bpy) (*μαύρο πώμα*), 1 φιαλίδιο, 9ml

### 3.1.6.ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι οροί πλάσματος ασθενών με σήψη από την Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

## 3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.2.1. TCA/DOC ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

Αυτή η διαδικασία ακολουθείται προκειμένου να καθαριστεί ένα δείγμα από τα συστατικά. Αραιώνουμε το δείγμα μέχρι τα 100λ. Προσθέτουμε 10λ DOC 0,15% και αφήνουμε το μίγμα στον πάγο για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προσθέτουμε 10λ TCA 100% ή 72% και αφήνουμε πάλι στον πάγο για δέκα λεπτά και μετά στους -20° C για μισή ώρα. Φυγοκεντρούμε στις 12000rpm/15' και αφαιρούμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε 200λ TCA 2,5% για μία πλύση

και το αφαιρούμε αμέσως χωρίς να ακουμπήσουμε το ίζημα. Αν το ίζημα διαλυθεί κάνουμε ξανά φυγοκέντρηση 12000rpm/15' και αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο. Προσθέτουμε παγωμένη ακετόνη δύο φορές για έκλυση. Μετά την προσθήκη ακετόνης φυγοκεντρούμε στις 12000rpm/15' . Αφήνουμε την περίσσεια ακετόνης να εξατμιστεί και προσθέτουμε το loading buffer 4X 20 μl. Τέλος βράζουμε το δείγμα με το loading buffer για πέντε λεπτά στους 95°C.

### 3.2.2. ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΟΝΟΣΤΙΒΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕ ΘΡΥΨΙΝΗ

Η ανακαλλιέργεια είναι απαραίτητη όταν η φλάσκα έχει τόσα κύτταρα που καλύπτουν όλο το ταπήτιο οπότε δεν υπάρχει πλέον χώρος να αναπτυχθούν περαιτέρω. Αρχικά, απομακρύνουμε το υλικό της καλλιέργειας και πλένουμε με διάλυμα PBS 1X. Προσθέτουμε διάλυμα θρυψίνης-EDTA 0.05% (2ml για φιάλη 75cm<sup>2</sup> και 1ml για φιάλη 25 cm<sup>2</sup>). Ακολουθεί καλή ανακίνηση της φιάλης έτσι ώστε το διάλυμα της θρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο. Τα κύτταρα στο μικροσκόπιο τώρα φαίνονται σαν μικρές σφαίρες, λόγω της αποκόλλησης. Μεταφέρουμε τα κύτταρα στον κλίβανο 37°C για περίπου 1-2'. Για να αποκολληθούν τα κύτταρα χτυπήστε ελαφρά τη φιάλη στο πλάι (flick). Προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα υλικού (10ml για φιάλη 75cm<sup>2</sup> και 5ml για φιάλη 25 cm<sup>2</sup>) για την επαναιώρηση των κυττάρων και αναδεύουμε τη φιάλη για ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων.

### 3.2.3. ΦΥΛΑΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ακολουθείται η διαδικασία θρυψινοποίησης κυττάρων (3.2.2). Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 0,5 ml κρουοπροστατευτικού υλικού για T25 flask (MEM + 20% FBS+10% DMSO). Για ένα φιαλίδιο (cryovial) απαιτούνται 2 T25

flasks ή 1 T75 flask. Τοποθετείστε μέσα σε cryobox για αργό πάγωμα (1°C/1 min) στους -80°C. Αποθήκευση στους -80°C ή σε υγρό άζωτο.

#### 3.2.4. ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα αποθηκευμένα φιαλίδια (cryovials) στους -80°C, εμβαπτίζονται αμέσως σε υδατόλουτρο 37°C με ήπια ανάδευση στο οποίο προσθέτουμε λίγο οινόπνευμα ή χλωρίνη. Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα γίνεται καθαρισμός του φιαλιδίου με 70% αιθανόλη εξωτερικά. Ακολουθεί μεταφορά του αιωρήματος των κυττάρων σε flask και γίνεται προσθήκη υλικού MEM με 10% ορό (FBS) . Τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C για 4-8 ώρες μέχρι να προσκολληθούν (adherent). Προτιμάται η απομάκρυνση του υλικού και η προσθήκη φρέσκου υλικού με 10% ορό.

#### 3.2.5. ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Εκροφήστε το υλικό από τα κύτταρα και ξεπλύνετε με 1ml κρύο και αποστειρωμένο PBS κάθε πηγαδάκι. Απομακρύνετε και ακολουθήστε τη διαδικασία θρυψινοποίησης κυττάρων ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα. Ομογενοποιήστε με πιπετάρισμα, ξύστε τα υπόλοιπα κύτταρα και μεταφέρετε σε erpendorf. Τα παραπάνω βήματα πρέπει να γίνουν σε απαγωγό καθέτου νηματικής ροής. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 1λεπτό. Απομακρύνετε προσεχτικά το υπερκείμενο και επαναδιαλύστε το ίζημα σε 25μl 4x lysis buffer, παρουσία αναστολέων πρωτεασών. Παγώστε τα δείγματα σε υγρό άζωτο, μεταφέρετε στους 60°C για 3 λεπτά και αναδεύστε (vortex) .Επαναλάβετε τον παραπάνω κύκλο 3 φορές. Φυγοκεντρήστε σε μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό και κρατήστε το υπερκείμενο.

### 3.2.6. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ WESTERN BLOT

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε 7,5% SDS-gel πολυακρυλαμιδίου στα 130V για το separating gel και στα 170V για το running gel. Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε PVDF μεμβράνη με τη συσκευή Semidry Transfer System στα 270mA για 40 λεπτά. Βαφή της μεμβράνης με Ponceau red επιβεβαιώνει τη μεταφορά.

Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με Blocking Buffer για 1 ώρα, υπό συνεχή ανάδευση σε rollers σε θερμοκρασία δωματίου. Το πρώτο αντίσωμα προστίθεται σε αραιώση τέτοια ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι ίση με 0,25μg/ml και επωάζεται όλο το βράδυ στους 4°C υπό ανάδευση. με 2 πλυσίματα με Wash Buffer για 10 λεπτά το κάθε ένα ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα για μία ώρα υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου. Η αραιώση του δεύτερου αντισώματος goat anti-rabbit IgG-HRP αντιστοιχεί σε 1:10000. Ακολουθούν 5 πλυσίματα με PBS-T για 10-15 λεπτά το καθένα. Η εμφάνιση ECL ή ECL Plus γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Amersham.

### 3.2.7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Τα shRNA βρίσκονται σε stock βακτηρίων και αποθηκεύονται στους -80° C. Για να χρησιμοποιήσουμε τα shRNA για την διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων θα πρέπει να τα απομονώσουμε. Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες από το kit Μετά το τέλος της διαδικασίας απομόνωσης μετράμε την συγκέντρωση των πέντε διαφορετικών shRNA. Ο σχεδιασμός των shRNA έχει γίνει σε άλλη εργασία.



### ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ shRNAs- CNOT

ΟΝΟΜΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ng/μl)
shRNA 17868	162,8
shRNA 17869	138,0
shRNA 17870	185,1
shRNA 17871	111,5
shRNA 17872	71,4

#### 3.2.8. ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ Hep2

Η επιτυχία της εισαγωγής των shRNAs φέρει μέγιστης προσοχής για την πραγματοποίηση της αναμενόμενης αποσιώπησης. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων , ο αριθμός των κυττάρων καθώς και ο τρόπος χειρισμού είναι καθοριστικοί παράγοντες.

- Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει θρυψινοποίηση μιας T75 flask. Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται μετά από μέτρηση σε πλάκα Newbuer, και σε αυτή τη flask φτάνουν τα  $42,5 \cdot 10^5$  .
- Σε κάθε πηγαδάκι του 6-well plate προσθέτουμε 600λ κυττάρων ώστε ο τελικός αριθμός τους να είναι  $2,5 \cdot 10^5$  .
- Αφήνουμε τα κύτταρα να αναπτυχθούν για μία ημέρα στους 37°C ώστε κάθε well να έχει πληρότητα περίπου 90% και λιγότερη από 100%.
- Την επόμενη ημέρα ακολουθεί η διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων. Η εισαγωγή των shRNA στα κύτταρα γίνεται με τη χρήση της λιποπρωτεΐνης, λιποφεκταμίνης (lipofection).
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο από κάθε well.

- Αφού ξεπλύνουμε κάθε well με κρύο και αποστειρωμένο PBS τρεις φορές, προσθέτουμε θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά, αντιμυκητωτικά και χωρίς ορό(FBS).
- Συνεχίζουμε παρασκευάζοντας το πρώτο διάλυμα (mix 1) που θα περιέχει τη λιποφεκταμίνη και το δεύτερο διάλυμα (mix 2) το οποίο θα περιέχει τα shRNA.

**ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ DNA ΚΑΙ ΛΙΠΟΦΕΚΤΑΜΙΝΗΣ,  
ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ.**

<b>MIX 1</b>	
DNA/MEM = 1γ DNA /50λ MEM	MIX 1
MEM	100λ
DNA	2γ
<b>MIX 2</b>	
LIPOFECTAMINE/MEM = 2λ/ 50λ	MIX 2
MEM	1050
LIPOFECTAMINE	42

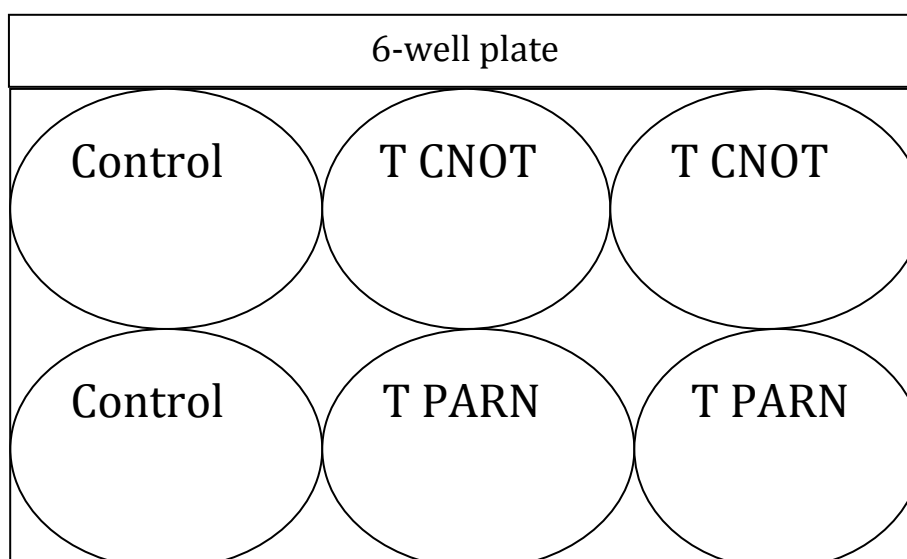
- Οι ποσότητες για κάθε mix υπολογίζονται από το πρωτόκολλο της INVITROGEN “Transfection with lipofectamine 2000”(invitrogen Cat:11668-027). Κάθε mix επωάζεται για πέντε λεπτά.

**ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ shRNA ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ**

shRNA 17868	3,1λ
shRNA 17869	3,6λ
shRNA 17870	2,7λ
shRNA 17871	4,5λ
shRNA 17872	7λ

- Συνδυάζουμε τα mix 1 και 2 και τα αφήνουμε για επώαση από πέντε μέχρι είκοσι λεπτά (mix 3). Η επώαση δεν πρέπει να ξεπεράσει τα είκοσι λεπτά

- Το πρώτο και το έκτο well δεν διαμολύνεται καθώς θα το χρησιμοποιήσουμε συγκριτικά με τα αυτά που έχουν διαμολυνθεί ως control. Από το δεύτερο μέχρι το τέταρτο έχουν διαμολυνθεί.



### 3.2.9. LIPOFECTION

Η διαμόλυνση με λιποφεκταμίνης είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για να εισάγει γενετικό υλικό μέσα σε κύτταρα μέσω των λιποσωμάτων (κύστες) τα οποία εύκολα μπορούν να απορροφηθούν από τη κυτταρική μεμβράνη αφού και τα δύο αποτελούνται από φωσφορική διπλοστοιβάδα. Τα κύρια πλεονεκτήματα είναι η αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης σε όλους τους τύπους νουκλεϊκών οξέων και σε πολλά είδη κυττάρων. Υπάρχει ευκολία στη χρήση της και χαμηλή τοξικότητα, είναι κατάλληλη για όλα τα είδη διαμόλυνσης (σταθερής σειράς, co-transfection) και τέλος είναι αποτελεσματική σε μερικές in vivo μεθόδους. (*Felger JH et al 1994*).

### 3.2.10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA

Η απομόνωση του RNA έγινε βάσει του πρωτοκόλλου «Total RNA isolation» Nucleospin® RNA II Nucleospin® RNA L Macherey-Nagel.

### 3.2.11. Ανοσολογική μέθοδος ηλεκτροχημειοφωταύγειας “ECLIA”

Αρχή διπλής ανοσοσήμανσης (“σάντουιτς”). Η συνολική διάρκεια της ανάλυσης είναι 18 λεπτά. Κατά την 1<sup>η</sup> επώαση, το αντιγόνο που περιέχεται σε

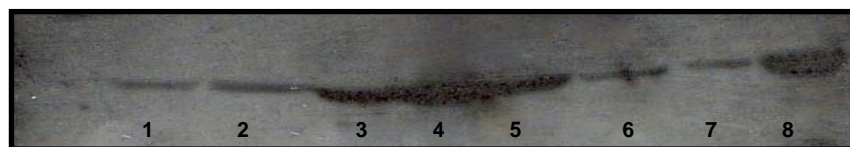
20 µL δείγματος, ένα βιοτινυλιωμένο πολυκλωνικό ειδικό αντίσωμα έναντι του NT-proBNP και ένα πολυκλωνικό ειδικό αντίσωμα έναντι του NT-proBNP σημασμένο με σύμπλοκο ρουθηνίου σχηματίζουν σύμπλοκο “σάντουιτς”. Κατά την 2<sup>η</sup> επώαση, γίνεται προσθήκη μικροσφαιριδίων επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη και έπειτα το σύμπλοκο δεσμεύεται στη στρερεά φάση μέσω της αλληλεπίδρασης της βιοτίνης με τη στρεπταβιδίνη. Το μίγμα αντίδρασης εισάγεται με αναρρόφηση στο θάλαμο μέτρησης, όπου τα μικροσφαιρίδια δεσμεύονται μαγνητικά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Οι μη δεσμευμένες ουσίες απομακρύνονται κατόπιν με ProCell. Η εφαρμογή τάσης στο ηλεκτρόδιο προκαλεί κατόπιν την εκπομπή χημειοφωταύγειας, η οποία μετράται με φωτοπολλαπλασιαστή. Τα αποτελέσματα προσδιορίζονται από μια καμπύλη βαθμονόμησης, η οποία παράγεται ειδικά για κάθε αναλυτή, μέσω μιας διαδικασίας βαθμονόμησης 2 σημείων και μιας πρότυπης καμπύλης που λαμβάνεται μέσω του γραμμικού κώδικα των αντιδραστηρίων.

Η ανοσολογική μέθοδος “ECLIA” χρησιμοποιήθηκε για τον *in vitro* ποσοτικό προσδιορισμό του N-τελικού τμήματος του προ-εγκεφαλικού πεπτιδίου σε ανθρώπινο ορό και πλάσμα. Η μέθοδος προσδιορισμού proBNP Elecsys σνδείκνυται ως βοήθημα στη διάγνωση σε άτομα για τα οποία υπάρχει υποψία ότι πάσχουν από συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, καθώς και στην ανίχνευση ήπιων μορφών καρδιακής δυσλειτουργίας. Η μέθοδος proBNP Elecsys ενδείκνυται επίσης για την κατάταξη του κινδύνου σε ασθενείς που παρουσιάζουν οξύ στεφανιαίο σύνδρομο και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, ενώ μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της θεραπείας σε ασθενείς με δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας. Η ανοσολογική μέθοδος ηλεκτροχημειοφωταύγειας “ECLIA” προορίζεται για χρήση στους ανοσολογικούς αναλυτές ELECSYS 1010/2010 και MODULAR ANALYTICS E170 (μονάδα Elecsys) της Roche.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. Ανοσοαποτύπωση σε δείγματα ορών από σηπτικούς ασθενείς

Οροί πλάσματος ασθενών με σήψη από τη Μονάδας Εντατικής Θεραπείας εξετάστηκαν με ανοσοαποτύπωση (WESTERN BLOT) για την ανίχνευση του εγκεφαλικού νατριουρητικού πεπτιδίου και του εγκεφαλικού νατριουρητικού προπεπτιδίου. Χρησιμοποιήθηκαν δύο φυσιολογικοί (M) και δύο σηπτικοί ασθενείς (ΣΑ, ΚΑ). Η δειγματοληψία των ασθενών έγινε σε διάστημα 1, 3 και 5 ημερών για τον ασθενή ΣΑ και 1, 3 και 10 ημερών για τον ασθενή ΚΑ.



**ΕΙΚΟΝΑ 4.1** Επίπεδα έκφρασης proBNP σε σηπτικούς ασθενείς. Η ανάλυση έγινε σε ορούς πλάσματος ασθενών και η ανίχνευση με WESTERN BLOT με κατάλληλα αντισώματα έναντι του proBNP.



**ΕΙΚΟΝΑ 4.2** Επίπεδα έκφρασης BNP σε σηπτικούς ασθενείς. Η ανάλυση έγινε σε ορούς πλάσματος ασθενών και η ανίχνευση με WESTERN BLOT με κατάλληλα αντισώματα έναντι του BNP.

1	M
2	M
3	ΣΑ 29/06
4	ΣΑ 02/07
5	ΣΑ 07/07
6	ΚΑ 12/07
7	ΚΑ 15/07
8	ΚΑ 22/07

Από τα αποτελέσματα διαπιστώνουμε ότι το BNP εκφράζεται αποκλειστικά σε ασθενείς και η συγκέντρωσή του αυξάνεται ανάλογα με το

στάδιο της σήψης. Αντιθέτως, το προπεπτιδίο proBNP ανιχνεύεται σε όλα τα δείγματα ορού, αλλά στους ασθενείς είναι φανερό η υψηλότερη συγκέντρωσή του.

Σύμφωνα με τις εικόνες της ανοσοαποτύπωσης, παρατηρούμε ότι η έκφραση του BNP και του proBNP αυξάνεται με τη πρόοδο των σηπτικών συνθηκών, αποτελέσματα που συμπίπτουν με τις μελέτες άλλων ερευνητών για τη συσχέτιση του proBNP με τη σήψη. Συγκεκριμένα, στους ασθενείς ΣΑ και ΚΑ βλέπουμε ότι την τελευταία μέρα δειγματοληψίας η ανίχνευση των πεπτιδίων είναι σημαντικά πιο έντονη σε σύγκριση με τη πρώτη μέρα που συλλέχθηκαν τα δείγματα ορού.

#### **4.2. ECLIA- ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ**

Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε ανάλυση των δειγμάτων ΣΑ και ΚΑ μαζί με 16 ασθενείς με διαγνωσμένη σήψη με την ανοσολογική μέθοδο ηλεκτροχημειοφωταύγειας “ECLIA”.

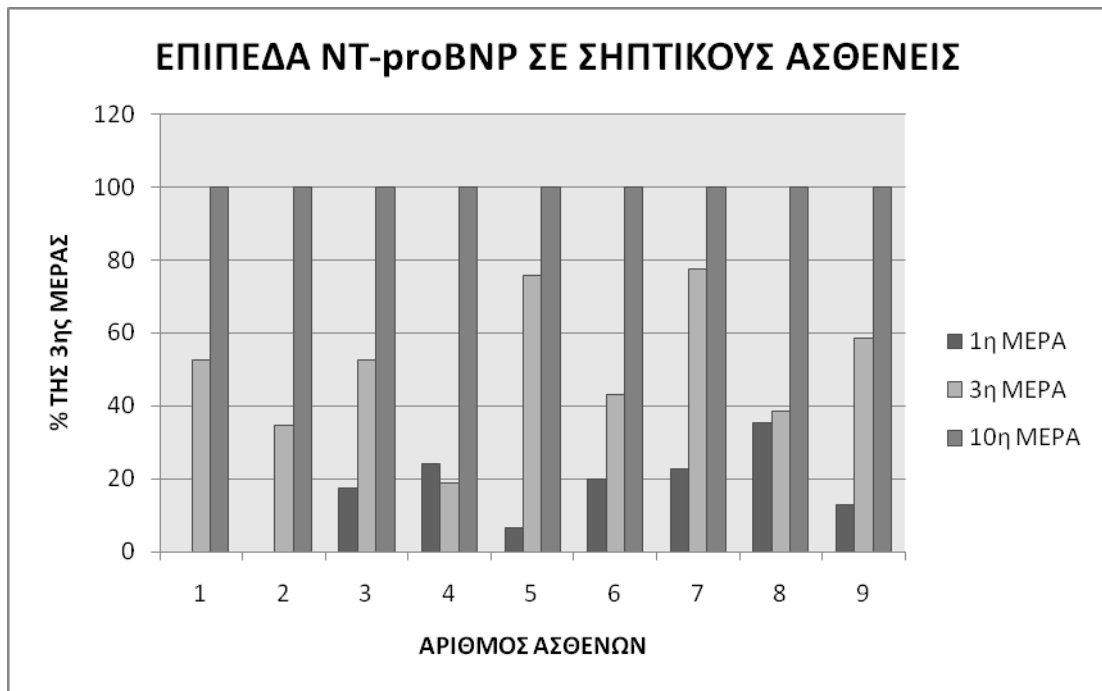
<b>ΑΣΘΕΝΕΙΣ</b>	<b>1η ΜΕΡΑ</b>	<b>3η ΜΕΡΑ</b>	<b>10η ΜΕΡΑ</b>
1	349,7	343,6	46,7
2	830	3053	2266
3	30480	5834	-
4	80,52	67,23	67,82
5	486,7	55,06	546,8
6	1627	632,1	-
7	16221	5612	-
8	494,7	1485	2823
9	7,84	176	45,05
10	7537	4939	-
11	3199	2524	13330
12	1500	1023	909,1
13	13,91	157,4	208,2
14	1630	3507	8155
15	296,8	192,9	239,5
16	26,99	91,97	118,7
17	298,3	170,4	261
18	1350	1474	3822
19	4970	22838	39040
20	17805	29539	13693

**Πίνακας 4. 1 Αποτελέσματα της μεθόδου ECLIA. Μετρήθηκαν δείγματα ορών από σηπτικούς ασθενείς τα οποία ελήφθησαν την 1<sup>η</sup> μερα, την 3<sup>η</sup> μέρα και την 10<sup>η</sup> μέρα. Η έλλειψη αποτελέσματος σε κάποιους ασθενείς δηλώνει ότι κατέληξαν.**

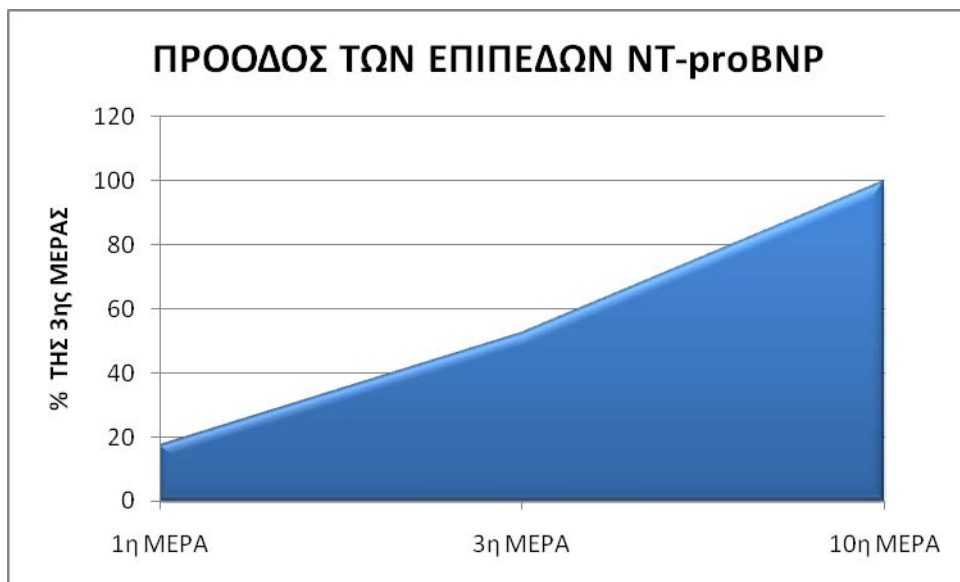
Δείγματα ορού σηπτικών ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια συλλέχθηκαν σε τρεις δόσεις. Το πρώτο δείγμα αντιστοιχεί στην πρώτη μέρα, το δεύτερο δείγμα συλλέχθηκε μετά από 2 μέρες (3<sup>η</sup> μέρα) και το τελευταίο μετά από 6 μέρες (10<sup>η</sup> μέρα). Κατ' αυτόν τον τρόπο εξετάζουμε ποσοτικά τα επίπεδα του NT-proBNP σύμφωνα με την εξέλιξη της σήψης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανοσοηλεκτροχημειοφωταύγειας παρατηρείται (διάγραμμα 4.1 και 4.2) αύξηση της έκφρασης του NT-proBNP με την εξέλιξη της σήψης των ασθενών. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με την απεικόνιση της ανοσοαποτύπωσης καθώς και με τη βιβλιογραφία.





**Διάγραμμα 4. 1** Στο διάγραμμα διακρίνεται η ποσοστιαία αύξηση των επιπέδων έκφρασης του NT-proBNP με την πρόοδο της σηπτικής κατάστασης των ασθενών σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου ECLIA. Χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα των 9 πρώτων ασθενών.



**Διάγραμμα 4. 2** Στο διάγραμμα διακρίνεται η ποσοστιαία πρόοδος των επιπέδων έκφρασης του NT-proBNP με την εξέλιξη της σηπτικής κατάστασης των ασθενών σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου ECLIA.

### 4.3. Ανίχνευση proBNP σε καρκινικά κύτταρα Hep2

Μετά από καλλιέργεια σε 6-well plate της καρκινικής κυτταρικής σειράς Hep2 έγινε ανοσοαποτύπωση και ανιχνεύθηκε το προπεπτιδίο pro-BNP σε δείγμα κυττάρων και σε δείγμα από το υπερκείμενο υγρό των ίδιων κυττάρων.



**ΕΙΚΟΝΑ 4. 3** Η ανάλυση έγινε σε σε καρκινικά κύτταρα (C) και στο υπερκείμενο υγρό (S/N) και η ανίχνευση με WESTERN BLOT με κατάλληλα αντισώματα έναντι του NT-proBNP.

Στη δοκιμασία ανίχνευσης του πεπτιδίου BNP στην ίδια καρκινική σειρά, το πεπτιδίο εντοπίστηκε μόνο στο υπερκείμενο υγρό.



**ΕΙΚΟΝΑ 4. 4** Η ανάλυση έγινε σε σε καρκινικά κύτταρα (C) και στο υπερκείμενο υγρό (S/N) και η ανίχνευση με WESTERN BLOT με κατάλληλα αντισώματα έναντι του BNP.

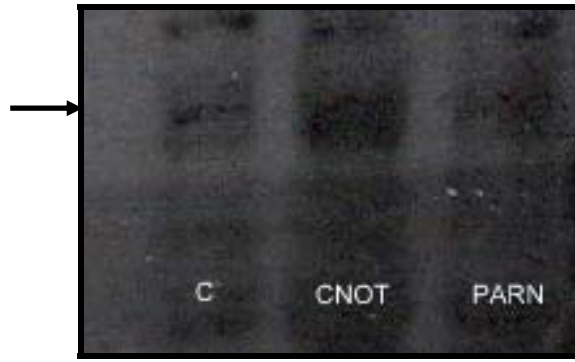
Παρατηρούμε, λοιπόν, ότι το προπεπτιδίο NT-proBNP εκφράζεται και σε καρκινικά κύτταρα, γεγονός το οποίο δεν αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Επιπλέον, ενδιαφέρον προκαλεί και η έκφραση του BNP στο υπερκείμενο υγρό των καρκινικών κυττάρων, καθώς στη βιβλιογραφία δεν εντοπίζεται

προηγούμενη μελέτη έκφρασης του συγκεκριμένου πεπτιδίου σε καρκινικά κύτταρα.

#### **4.4. Ανοσοαποτύπωση ύστερα από διαμόλυνση της καρκινικής σειράς Her2**

Δοκιμάσαμε να αποσιωπήσουμε τις αποαδενυλάσες CNOT και PARN για να συγκρίνουμε την έκφραση του proBNP στη καρκινική σειρά Her2. Για τον έλεγχο της ρύθμισης της έκφρασης του NT-proBNP στην καρκινική κυτταρική σειρά Her2 ηλεκτροφορήσαμε σε gel πολυακρυλαμίδης δείγματα από τα διαμολυσμένα, με shRNAs, κύτταρα καθώς και δείγματα κυττάρων που δεν είχαν διαμολυνθεί. Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε μεταφορά των πρωτεϊνών του gel πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη PVDF. Το αποτέλεσμα της έκφρασης του NT-proBNP φαίνεται στην παρακάτω εικόνα η οποία δείχνει το εικόνα που πήραμε από την ανοσοαποτύπωση. (Western blot)

Στην ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από φυσιολογικά καρκινικά κύτταρα (C), καρκινικά κύτταρα μετά αποσίωση της αποαδενυλάσης CNOT (CNOT), και καρκινικά κύτταρα μετά από αποσίωση της αποαδενυλάσης (PARN).



**ΕΙΚΟΝΑ 4. 5** Αποσιώπηση των αποαδενυλασών *CNOT* και *PARN* σε καρκινικά κύτταρα. Δείγματα από φυσιολογικά καρκινικά κύτταρα, καρκινικά κύτταρα μετά αποσιώπηση της αποαδενυλάσης *CNOT* (*CNOT*), και καρκινικά κύτταρα μετά από αποσιώπηση της αποαδενυλάσης (*PARN*) αναλύθηκαν με *WESTERN BLOT* χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του *NT-proBNP*.

Από τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης παρατηρούμε ότι η *CNOT* παίζει ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του *NT-proBNP* εφόσον μετά την αποσιώπηση της στα καρκινικά κύτταρα ανιχνεύεται σε μεγαλύτερη ένταση το πεπτίδιο.

Η αποσιώπηση της αποαδενυλάσης *PARN* δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση του *NT-proBNP*.

## **5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε αρχικά την έκφραση του NT-proBNP σε σηπτικούς ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (*Masashi Mukoyama et al, 1991*), η καρδιακή ανεπάρκεια είναι από τους κύριους παράγοντες αύξησης της έκφρασης του εγκεφαλικού νατριουρητικού πεπτιδίου στο αίμα, καθώς επίσης και οι σηπτικές συνθήκες παίζουν ρόλο στην έκκρισή του.

Μετά από εφαρμογή της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης WESTERN BLOT σε δείγματα ορών σηπτικών ασθενών επιβεβαιώσαμε την έκφραση του BNP καθώς και του NT-proBNP σε συνθήκες σήψης μετά από καρδιακή ανεπάρκεια (*εικόνες 4.1 και 4.2*). Κατόπιν, συγκρίνουμε ποσοτικά τη έκφραση του NT-proBNP κατά την εξέλιξη της σηπτικής κατάστασης των ασθενών με την ανοσολογική μέθοδο ανοσοηλεκτροχημειοφωταύγειας “ECLIA”. Παρατηρούμε ότι η έκφραση του πεπτιδίου αυξάνεται με τη πρόοδο της σήψης, άρα υπάρχει εμφανής συσχέτιση του NT-proBNP με τη σήψη, γεγονός που μαρτυρεί μεταβολή των επιπέδων έκφρασής του.

Στη συνέχεια, ερευνούμε αν το BNP και το NT-proBNP ανιχνεύονται σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων Hep2, για να εξετάσουμε τους παράγοντες ρύθμισης της έκφρασής τους, τη στιγμή που δεν αναφέρεται κάτι σχετικό στη βιβλιογραφία. Πράγματι, το NT-proBNP εκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα ενώ το BNP ανιχνεύεται μόνο στο υπερκείμενο υγρό των κυττάρων αυτών (*εκόνες 4.3 και 4.4*).

Μετά από αυτά τα αποτελέσματα μπορέσαμε να θέσουμε τις βάσεις ώστε να εξετάσουμε από τι ρυθμίζεται η έκφραση του NT-proBNP εξετάζοντας δύο παράγοντες, την αποαδενυλάση CNOT και την αποαδενυλάση PARN. Μετά από διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων και επιτυχή αποσιώπηση της CNOT και έπειτα της PARN, εξετάσαμε σε εκχυλίσματα των διαμολυσμένων κυττάρων την έκφραση του NT-proBNP. Η ανίχνευση έγινε με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης “WESTERN BLOT” και χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα φυσιολογικών κυττάρων, κυττάρων στα

οποία έχει αποσιωποηθεί η CNOT και κύτταρα στα οποία έχει αποσιωποηθεί η PARN. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (εικόνα 4.5), η CNOT εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης του NT-proBNP αφού μετά την αποσιώπησή της αυξάνεται σημαντικά η έκφραση του πεπτιδίου. Αυτό σημαίνει πως όταν απουσιάζει η CNOT7, το mRNA του proBNP, επιβιώνει για περισσότερο χρόνο και άρα παράγει περισσότερο proBNP, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στην ανοσοαποτύπωση της εικόνας 4.5. Η άλλη αποαδενυλάση, PARN, φαίνεται πως και αυτή επηρεάζει την έκφραση, αλλά σε μικρότερο βαθμό. Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει ότι τα δύο αυτά ένζυμα και κυρίως η CNOT7 εμπλέκονται στη ρύθμιση του χρόνου ζωής του mRNA NT-proBNP και κατ' επέκταση του ίδιου του NT-proBNP. Οι παρατηρήσεις αυτές χρήζουν και αξίζουν περισσότερη διερεύνηση.

Σημειώνεται πως αυτή είναι η πρώτη παρατήρηση όπου φαίνεται ο τρόπος ρύθμισης της έκφρασης του proBNP, μέσω του χρόνου ζωής του mRNA του από τις δύο αυτές αποαδενυλάσες. Οι παρατηρήσεις της παρούσης εργασίας μπορούν να λειτουργήσουν ως αφετηρία για περαιτέρω διεκρίνιση και αποκάλυψη του μηχανισμού της ρύθμισης έκφρασης του proBNP. Για παράδειγμα, θα μπορούσε να ελεγχθεί αν υπάρχουν και άλλα τέτοια ένζυμα (αποαδενυλάσες) ή σχετιζόμενοι με αυτές παράγοντες, που ρυθμίζουν την έκφραση του mRNA. Παράλληλα, σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης με PCR αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (real time RT-PCR), ώστε να υπάρχει και μια άλλη μέθοδος επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων μαζί με αυτή της ανοσοαποτύπωσης.

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- ❖ *C. Wold Knudsen, H. Vik-Mo and T. Omland. Blood haemoglobin is an independent predictor of B-type natriuretic peptide (BNP), Clinical Science (2005) 109, 69–74.*
- ❖ *Masashi Mukoyama et al. Brain Natriuretic Peptide as a Novel Cardiac Hormone in Humans Evidence for an Exquisite Dual Natriuretic Peptide System, Atrial Natriuretic Peptide and Brain Natriuretic Peptide, The American Society for Clinical Investigation, Volume 87, April 1991, 1402-1412.*
- ❖ *Wei Yan et al. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme, PNAS July 18, 2000 vol. 97 no.15, 8525–8529.*
- ❖ *M. Kohno, K Yasunari, K Yokokawa, K Murakawa, T. Horio, and T. Takeda. Inhibition by Atrial and Brain Natriuretic Peptides of Endothelin-1 Secretion after Stimulation with Angiotensin 11 and Thrombin of Cultured Human Endothelial Cells, The American Society for Clinical Investigation, Volume 87, June 1991, 1999-2004.*
- ❖ *Nakagawa et al. Rapid Transcriptional Activation and Early mRNA Turnover of Brain Natriuretic Peptide in Cardiocyte Hypertrophy, Evidence for Brain Natriuretic Peptide as an "Emergency" Cardiac Hormone against Ventricular Overload. The American Society for Clinical Investigation, Volume 96, September 1995, 1280-1287.*
- ❖ *Duolikun Rehemudula, Tomohiro Nakayama, Masayoshi Soma, Yukie Takahashi, Jiro Uwabo, Mikano Sato, Yoichi Izumi, Katsuo Kanmatsuse and Yukio Ozawa. Structure of the Type B Human Natriuretic Peptide Receptor Gene and Association of a Novel Microsatellite Polymorphism With Essential Hypertension, Circ. Res. 1999;84;605-610.*
- ❖ *K. Tomaru et al. Transcriptional Activation of the BNP Gene by Lipopolysaccharide is Mediated Through GATA Elements in Neonatal Rat Cardiac Myocytes, J Mol Cell Cardiol 34, 649–659 (2002).*

- ❖ *Faquan Liang and David G. Gardner. Mechanical strain activates BNP gene transcription through a p38/NF-κB-dependent mechanism, J. Clin. Invest.104:1603–1612 (1999).*
- ❖ *Faquan Liang, Jessica O Rear, Ute Schellenberger, Lungkuo Tai, Michael Lasecki, George F. Schreiner, Fred S. Apple, Alan S. Maisel, N. Stephen Pollitt and Andrew A. Protter. Evidence for Functional Heterogeneity of Circulating B-Type Natriuretic Peptide, J Am Coll Cardiol, 2007; 49:1071-1078.*
- ❖ *G. Michael Felker, John W. Petersen, Daniel B. Mark. Natriuretic peptides in the diagnosis and management of heart failure, CMAJ September 12, 2006 175(6), 611-617.*
- ❖ *Li et al. / J Zhejiang Univ SCI 2005 6B(9):877-884, Brain natriuretic peptide and optimal management of heart failure.*
- ❖ *Tsuruda et al. Brain Natriuretic Peptide Is Produced in Cardiac Fibroblasts and Induces Matrix Metalloproteinases, Circulation Research December 13/27, 2002, 1127-1134.*
- ❖ *Shin-Ichi Suga, Kazuwa Nakao, Kiminori Hosoda, Masashi Mukoyama, Yoshihiro Ogawa, Gotaro Shirakami, Hiroshi Arai, Yoshihiko Saito, Yoshikazu Kambayashi, Ken Inouye, and Hiroo Imura. Receptor Selectivity of Natriuretic Peptide Family, Atrial Natriuretic Peptide, Brain Natriuretic Peptide and C-Type Natriuretic Peptide. Endo. 1992 Vol.30, No. 1.*
- ❖ *Tsuruda et al. Cardiotrophin-1 Stimulation of Cardiac Fibroblast Growth Roles for Glycoprotein 130/Leukemia Inhibitory Factor Receptor and the Endothelin Type A Receptor. Circ Res. 2002;90:128-134.*
- ❖ *Athanasios G. Kuditis, Emmanouel I. Alexopoulos, Fotini Hatzi, Eleni Kostadima, Maria Kiaffas, Epameinondas Zakyntinos and Konstantinos Gourgouljanis. Overnight Change in Brain Natriuretic Peptide Levels in Children With Sleep-Disordered Breathing. Chest 2006;130;1377-1384.*
- ❖ *Raquel Rollvn, Aranzazu Mediero, Manuela Roldan-Pallaris, Arturo Fernandez-Cruz, Raquel Fernandez-Durango. Natriuretic peptide system in the human retina. Molecular Vision 2004; 10:15-22.*



- ❖ *H. Kita et al. The nocturnal secretion of cardiac natriuretic peptides during obstructive sleep apnoea and its response to therapy with nasal continuous positive airway pressure. J. Sleep Res. (1998)7, 199-207.*
- ❖ *Urban Alehagen, Goran Lindstedt, Henry Eriksson, and Ulf Dahlstrom. Utility of the Amino-Terminal Fragment of Pro-Brain Natriuretic Peptide in Plasma for the Evaluation of Cardiac Dysfunction in Elderly Patients in Primary Health Care. Clinical Chemistry 49:8, 1337–1346 (2003).*
- ❖ *B. MULLER et al. Circulating levels of pro-atrial natriuretic peptide in lower respiratory tract infections. Journal of Internal Medicine 2006; 260: 568–576.*
- ❖ *Y.H. Park et al. BNP as a marker of the heart failure in the treatment of imatinib mesylate. Cancer Letters 243 (2006) 16–22.*
- ❖ *Burjonrappa et al. Cancer Patients With Markedly Elevated B-Type Natriuretic Peptide May Not Have Volume Overload. American Journal of Clinical Oncology , Volume 30, Number 3, June 2007, 287–293.*
- ❖ *K. Tomaru et al. Transcriptional Activation of the BNP Gene by Lipopolysaccharide is Mediated Through GATA Elements in Neonatal Rat Cardiac Myocytes. J Mol Cell Cardiol 34, 649-659 (2002).*
- ❖ *Koller KJ, Goeddel DV: Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. Circulation 1992; 86:1081–1088.*
- ❖ *Mukoyama M, Nakao K, Hosada K, et al: Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. J Clin Invest 1991; 87:1402–1412.*
- ❖ *Maisel AS: B-type natriuretic peptide (BNP)level: Diagnostic and therapeutic potentials. Rev Cardiovasc Med 2001; 2:S13–S184.*
- ❖ *Rudiger A, Gasser S, Fischler M, et al: Comparable increase of B-type natriuretic peptide and amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in patients with severe sepsis, septic shock, and acute heart failure. Crit Care Med 2006; 34:2140–2144.*
- ❖ *Tung RH, Garcia C, Morss A, et al: Utility of B-type natriuretic peptide for the evaluation of intensive care unit shock. Crit Care Med 2004;32:1643–1647.*
- ❖ *Charpentier J, Luyt C, Fulla Y, et al: Brain natriuretic peptide: A marker of myocardial dysfunction during severe sepsis. Crit Care Med 2004; 32:660–665.*