



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΙΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ**

**«Ανάπτυξη, χαρακτηρισμός και μοριακή φαινοτύπηση κυτταρικών
κλώνων υπερέκφρασης της πρωτεΐνης του σωματίου συναρμογής
FRA10AC1»**

**ΟΥΛΙΑΝΑ ΙΒΑΝΤΣΙΚ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΠΑΤΡΑ, 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νικόλαος Μοσχονάς
(Επιβλέπων Καθηγητής)

Καθηγητής, Διευθυντής Εργαστηρίου Γενικής
Βιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Μαρία Κλάπα
(Συνεπιβλέπουσα Καθηγήτρια)

Ερευνήτρια Β' βαθμίδας, Εργαστήριο
Μεταβολομικής Μηχανικής και Συστημικής
Βιολογίας,
Ινστιτούτο Επιστημών Χημικής Μηχανικής,
Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας

Θεολογία Σαραφίδου

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής
Ζωικών Οργανισμών
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής ολοκληρώνεται για εμένα ένας κύκλος σπουδών και ένας κύκλος στη ζωή μου που θα μου λείψει πολύ... Στα τρία χρόνια που πέρασαν έζησα χαρές, λύπες, αλλαγές, απρόοπτα, καταστάσεις δύσκολες ... αλλά αυτό που θα μου μείνει είναι οι γνώσεις και τα διδάγματα που αποκόμισα και οι όμορφες στιγμές που έζησα με τους «Πανεπιστημιακούς φίλους» μου.

*Η μεγαλύτερη ευχαριστία ανήκει στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μοσχονά, που παρά τα τόσα εμπόδια που υπήρχαν, με δέχτηκε στο εργαστήριό του πριν τέσσερα χρόνια, με εμπιστεύτηκε, με καθοδήγησε και με πίεσε πολλές φορές, κάνοντάς με να εξελιχθώ και να αποκομίσω γνώσεις και ξεχωριστό τρόπο σκέψης. Η κ. Κλάπα ήταν ο άνθρωπος που άνοιξε τους ορίζοντές μου προσφέροντάς μου γνώσεις βιοπληροφορικής, που είναι απαραίτητες στην έρευνα σήμερα και θα αποτελέσουν σημαντικό εφόδιο στη μετέπειτα πορεία μου. Φυσικά, οφείλω να ευχαριστήσω την κ. Σαραφίδου που στα πλαίσια της Διδακτορικής της Διατριβής το 2004 ταυτοποίησε το γονίδιο *FRA10AC1* που μελέτησα συστηματικά στην έρευνά μου στο εργαστήριο και για τις πολλές εύστοχες παρατηρήσεις της στο κείμενο της διατριβής και τα υποστηρικτικά της σχόλια κατά τη προφορική παρουσίαση της εργασίας μου.*

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στο σύζυγό μου Αλέξη και την κόρη μου Γεωργία για την υπομονή που έδειξαν τα τρία αυτά χρόνια, ήταν πάντα δίπλα μου κατανοώντας και εμψυχώνοντάς με σε κάθε βήμα. Και στην οικογένεια τη δική μου και του άντρα μου που με στηρίζουν και με βοηθούν να προοδεύσω.

Οι συνάδελφοί μου στο εργαστήριο, η Ευρυδίκη, η Γωγώ, ο Γιώργος και η Παναγιώτα, έβαλαν ο καθένας το λιθαράκι του στην ολοκλήρωση αυτού του κύκλου, προσφέροντάς μου γνώσεις και όμορφες αναμνήσεις εντός και εκτός του εργαστηρίου. Ευχαριστώ, επίσης, όλους του φίλους μου που με εμψύχωναν σε κάθε στάδιο.

στη Γεωργία
Ah my little angel! My beautiful and precious princess!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Το *FRA10AC1*, ένα εξελικτικά συντηρημένο γονίδιο σε όλα τα πολυκύτταρα και σε αρκετά μονοκυτταρικά είδη ευκαρυωτικών, έχει ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο ως υπεύθυνο για την εμφάνιση της εύθραυστης χρωμοσωματικής θέσης *FRA10A*. Η πρωτεΐνη FRA10AC1 έχει απομονωθεί βιοχημικά ως συστατικό του σωματίου συναρμογής και πρόσφατα δείχθηκε πειραματικά ο ρόλος της στην αναγνώριση εναλλακτικών θέσεων συναρμογής του pre-mRNA στο *Chlamydomonas reinhardtii*.

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η συμβολή στη λειτουργική ανάλυση της FRA10AC1, μέσω της εφαρμογής μοριακών τεχνικών και τη χρήση βιοϋπολογιστικών εργαλείων. Στόχος ήταν η ανάπτυξη και ο μοριακός χαρακτηρισμός κλώνων κυττάρων *HeLa* μόνιμης υπερέκφρασης ενός διαγονιδίου *FRA10AC1*, ώστε να αξιοποιηθούν στη μελέτη των συνεπειών της υπερέκφρασης στην κυτταρική φυσιολογία. Ως συνεισφορά στην περαιτέρω ανάλυση των κλώνων υπερέκφρασης και τη διαμόρφωση στοχευμένων ερωτημάτων υπό το πρίσμα της συστημικής βιολογίας, κρίθηκε σκόπιμη η διερεύνηση των βιολογικών χαρακτηριστικών της FRA10AC1 στο πλαίσιο του δικτύου άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της, αξιοποιώντας δεδομένα του λειτουργικού ρόλου των μελών του δικτύου και τα ιστοειδικά μεταγραφικά πρότυπα έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων.

Αποτελέσματα: Από μοναδιαία κύτταρα *HeLa* διαμολυσμένα σταθερά με το πλήρους μήκους διαγονίδιο *FRA10AC1*, αναπτύχθηκαν και αναλύθηκαν περισσότεροι από 20 κυτταρικοί κλώνοι. Ο ποιοτικός και ημι-ποσοτικός έλεγχος της υπερέκφρασης της FRA10AC1 πραγματοποιήθηκε σε μεταγραφικό επίπεδο αξιοποιώντας την τεχνολογία RT-PCR και σε πρωτεϊνικό επίπεδο με παρατήρηση σε μικροσκοπία ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωση. Τέσσερις κυτταρικοί κλώνοι δείχθηκε ότι πληρούν συνδυαστικά τα κριτήρια υπερέκφρασης του *FRA10AC1* σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο και προτείνονται για περαιτέρω ανάλυση. Η μελέτη του δικτύου άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 στον άνθρωπο αποκάλυψε 30 πρωτεΐνες-πρώτους γείτονες, ενώ διερεύνηση του δικτύου αλληλεπιδράσεων μεταξύ ορθόλογων πρωτεϊνών σε πρότυπους οργανισμούς, εμπλούτισε το δίκτυο της FRA10AC1 με 4 επιπλέον πιθανές αλληλεπιδράσεις. Οι πρώτοι γείτονες της FRA10AC1 συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Οι περισσότερες (16) ανήκουν στο δίκτυο πρωτεϊνών του σωματίου συναρμογής ισχυροποιώντας τα δεδομένα για τη συνεισφορά

της FRA10AC1 σε μηχανισμούς επεξεργασίας του mRNA, ενώ ένας μικρός αριθμός πρώτων γειτόνων της συμμετέχει σε μηχανισμούς μεταγραφής, μετάφρασης, ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και του μεταβολισμού και της οργάνωσης του κυτταροσκελετού, υποδεικνύοντας την ενδεχόμενη εμπλοκή της FRA10AC1 και σε αυτές τις διεργασίες. Με οπτικοποίηση και πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση των προτύπων έκφρασης του *FRA10AC1* και των γονιδίων που κωδικοποιούν τους πρώτους γείτονες της FRA10AC1 από 51 ιστούς καταχωρημένων στο πρόγραμμα GTEx, ανακατασκευάστηκαν αξιοποιώντας το λογισμικό ανάλυσης ομικών δεδομένων TM4/MeV, ιστοειδικά δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων όπου διακρίνεται η σχετική αφθονία και η ειδική ανά ιστό συμμετοχή κάθε πρωτεΐνης στο δίκτυο. Οι όρχεις παρουσιάζουν τη σημαντικότερη διαφοροποίηση, γεγονός που συνάδει και με το ότι σε αυτόν τον ιστό εντοπίζονται τρία επιπλέον εναλλακτικά μετάγραφα του *FRA10AC1* με συνεπαγόμενη σημαντική ετερογένεια στην καρβοξυ-τελική περιοχή των αντίστοιχων ισομαρφών FRA10AC1. Το *FRA10AC1* παρουσιάζει σημαντική ομοιότητα ως προς το πρότυπο έκφρασης με το γονίδιο *NKAP*, που κωδικοποιεί τον ομώνυμο μεταγραφικό παράγοντα, υποδεικνύοντας την ευρύτατη συρρύθμισή τους και την από κοινού συμμετοχή των δύο πρωτεϊνικών προϊόντων σε κυτταρικές λειτουργίες.

Συμπεράσματα: Ικανός αριθμός ανασυνδυασμένων κλώνων κυττάρων *HeLa* που αναπτύχθηκαν στην παρούσα εργασία πληρούν τις προϋποθέσεις για τη μελέτη του ρόλου της FRA10AC1 στη φυσιολογία του κυττάρου χρησιμοποιώντας συνδυαστικές ομικές αναλύσεις. Ο εμπλουτισμός του δικτύου αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 μέσω της διερεύνησης αλληλεπιδράσεων μεταξύ ορθολόγων πρωτεϊνών εγείρει το ερώτημα της πειραματικής επιβεβαίωσης αυτών των αλληλεπιδράσεων και στον άνθρωπο. Η ανακατασκευή των ιστο-ειδικών πρωτεϊνικών δικτύων της FRA10AC1 και οι ποσοτικές και ποιοτικές διαφοροποιήσεις στα επιμέρους δίκτυα που καταγράφηκαν, υπογραμμίζει την ανάγκη θεώρησης των δικτύων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων υπό το πρίσμα της ιστο-ειδικής γονιδιακής ενεργότητας. Ειδικότερα, η σημαντική διαφοροποίηση που παρατηρείται στον όρχι όσον αφορά τα παρατηρούμενα *FRA10AC1* εναλλακτικά μετάγραφα και το αντίστοιχο ιστο-ειδικό πρωτεϊνικό δίκτυο υποδεικνύει έναν ξεχωριστό ρόλο της FRA10AC1 στη λεπτή ρύθμιση που απαιτείται για την παραγωγή και διαφοροποίηση των γαμετών. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει το ευρύτατο κοινό πρότυπο μεταγραφικής ρύθμισης του *FRA10AC1* και του *NKAP* και η πειραματική διερεύνηση του ρόλου της FRA10AC1 στις λειτουργίες που συμμετέχει ο μεταγραφικός παράγοντας NKAP.

ABSTRACT

Introduction: *FRA10AC1*, an evolutionarily conserved gene in all multicellular and several monocyte species of eukaryotes, has been identified in human as responsible for the appearance of the fragile chromosomal site *FRA10A*. The FRA10AC1 protein has been isolated biochemically as a component of the spliceosome and has recently been shown experimentally to play a role in identifying alternative splice sites of pre-mRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*.

Aim: The aim of the present study was to contribute to the functional analysis of FRA10AC1, through the application of molecular techniques and the use of biocomputational tools. The aim was to develop and molecularly characterize *HeLa* cell clones of permanent overexpression of an *FRA10AC1* transgene, to be used in the study of the effects of overexpression on cell physiology. As a contribution to the further analysis of overexpression clones and the formation of targeted questions in the spectrum of systemic biology, it was deemed appropriate to investigate the biological characteristics of FRA10AC1 in the context of its direct protein interaction network using the transcriptional expression patterns of the respective genes.

Results: From *HeLa* cell clones stably transfected with the full-length *FRA10AC1* transgene, more than 20 cell clones were grown and analyzed. Qualitative and semi-quantitative control of *FRA10AC1* overexpression was performed at the transcriptional level using RT-PCR technology and at the protein level by observation using immunofluorescence microscopy and immunoblotting. Four cell clones were shown to meet the combined *FRA10AC1* overexpression criteria at the transcriptional and protein levels and are proposed for further analysis. The study of the FRA10AC1 direct protein interaction network in human revealed 30 first-neighbor proteins, while an investigation of the network of interactions between ortholog proteins in model organisms enriched the *FRA10AC1* allele network with 4 additional potential interactions. The first neighbors of FRA10AC1 are involved in various cellular functions. Most of them (16) have been biochemically identified as components of spliceosome amplifying data on the contribution of FRA10AC1 to mRNA processing mechanisms, while a small number of its first neighbors are involved in transcription, translation, regulation of cell cycle and metabolism and organization of cytoskeleton, indicating the possible involvement of FRA10AC1 in these processes as well. By visualization and multivariate statistical analysis of the expression patterns of

FRA10AC1 and the genes encoding the first neighbors of FRA10AC1 from 51 tissues registered in the GTEx portal, we reconstructed using TM4 / MeV group data analysis software, protein interaction networks distinguishing the relative abundance and tissue-specific participation of each protein in the network. The testes show the most significant differentiation, which is consistent with the fact that in this tissue are produced three additional alternative transcripts of *FRA10AC1* with significant heterogeneity in the carboxy-terminal region of the corresponding FRA10AC1 isoforms. *FRA10AC1* bears a significant similarity in expression pattern to the *NKAP* gene, which encodes the homonymous transcription factor, indicating their extensive co-regulation and the co-involvement of the two protein products in cellular functions.

Conclusions: A sufficient number of recombinant *HeLa* cell clones developed in the present work qualify for the study of the role of FRA10AC1 in cell physiology using combined group assays. The enrichment of the FRA10AC1 interaction network through the investigation of interactions between ortholog proteins raises the question of the experimental confirmation of these interactions in human as well. The reconstruction of the tissue-specific protein networks of FRA10AC1 and the quantitative and qualitative differences in the individual networks recorded, underline the need to consider the networks of protein interactions in the spectrum of tissue-specific gene activity. In particular, the significant differentiation observed in the testis with respect to the observed *FRA10AC1* alternative transcripts and the corresponding tissue-specific protein network indicate a distinct role of FRA10AC1 in the fine tuning required for the production and differentiation of gametes. Finally, it is interesting the broad common transcriptional regulatory standard of *FRA10AC1* and *NKAP* and the experimental investigation of the role of FRA10AC1 in the functions of the NKAP transcription factor.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	8
ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	14
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	17
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	18
Μοριακή φαινοτύπηση του βιολογικού ρόλου γονιδίων συνδυάζοντας μοριακές τεχνικές με εργαλεία βιοπληροφορικής.....	18
Ο βιολογικός ρόλος του <i>FRA10AC1</i>	21
Η εύθραυστη χρωμοσωματική θέση <i>FRA10A</i>	21
Το γονίδιο <i>FRA10AC1</i>	23
Η πρωτεΐνη <i>FRA10AC1</i>	27
Η πλειονότητα των πρώτων γειτόνων της <i>FRA10AC1</i> είναι συστατικά του σωματίου συναρμογής.....	29
Η <i>FRA10AC1</i> ως συστατικό του σωματίου συναρμογής.....	31
Η διαδικασία της συναρμογής.....	31
Ο ρόλος της <i>FRA10AC1</i> στο σωματίο συναρμογής.....	34
Συσχέτιση του <i>FRA10AC1</i> με νοσήματα βάσει Γενετικής Ανάλυσης Γονιδιωματικής Κλίμακας (GWAS).....	38
Μεθυλίωση του DNA – rs140546855.....	39
Νόσος του Alzheimer – rs116953792.....	40
Μείωση πνευμονικής λειτουργίας – rs79105493.....	42
Απόκριση σε φάρμακα για τη σχιζοφρένεια – rs75953396.....	43
Απόκριση σε φάρμακα για το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (HIV/AIDS) – rs59824868.....	44
Αποτελέσματα από την ομική ανάλυση κλώνων κυττάρων <i>HeLa</i> που υποεκφράζουν το <i>FRA10AC1</i>	45
ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΣΤΟΧΟΙ.....	46
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	47
Μοριακές τεχνικές.....	47
Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1/His A, B, και C.....	47
Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος DNA και RNA.....	50
Χρήση φασματοφωτόμετρου Quawell Q5000 (Thermo Fisher Scientific).....	50
Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης.....	51
Πέψη πλασμιδιακού DNA.....	53
Απομόνωση γραμμοποιημένου πλασμιδιακού DNA από το μείγμα της πέψης.....	55
Καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων <i>HeLa</i>	56
Η ιστορία των κυττάρων <i>HeLa</i>	57

Υλικά για την καλλιέργεια κυττάρων <i>HeLa</i>	58
Ανακαλλιέργεια κυττάρων.....	60
Μέτρηση ζωντανών κυττάρων.....	61
Κρυοσυντήρηση κυττάρων	63
Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων	64
Διαδικασία επιλογής των κλώνων κυττάρων.....	65
Ποιοτικός έλεγχος των διαμολυσμένων κυττάρων.....	66
Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από κύτταρα <i>HeLa</i>	66
Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα <i>HeLa</i>	67
Παρασκευή cDNA με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.....	68
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR).....	69
Ανοσοφθορισμός	73
Απομόνωση εκχυλίσματος πρωτεϊνών από κύτταρα <i>HeLa</i>	74
Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα.....	75
Ανοσοαποτύπωση Western (Western blotting)	76
Εργαλεία βιοπληροφορικής	81
Βάσεις δεδομένων.....	81
Η βάση δεδομένων UniProt (https://www.uniprot.org/).....	81
Η μετα-βάση δεδομένων PICKLE (www.pickle.gr)	81
Η βάση δεδομένων BioGRID (https://thebiogrid.org/).....	82
Η βάση δεδομένων IntAct (https://www.ebi.ac.uk/intact/).....	82
Η βάση δεδομένων Entrez Gene (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)	83
Η βάση δεδομένων FlyBase (https://flybase.org/)	83
Η βάση δεδομένων GTEx Portal (https://gtexportal.org/home/)	84
Εργαλεία βιοπληροφορικής	86
Το εργαλείο βιοπληροφορικής HomoloGene	86
Οπτικοποίηση δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με το εργαλείο βιοπληροφορικής Cytoscape.....	86
Λογισμικό πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης ομικών προτύπων TM4 / MeV	87
Πορεία για την ανακατασκευή του δικτύου άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με βάση το πρόσφατο πρωτεϊνικό δίκτυο του ανθρώπου και λειτουργικός χαρακτηρισμός των πρώτων γειτόνων της FRA10AC1	89
Πορεία για τη διεύρυνση του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με δεδομένα από ορθόλογες πρωτεΐνες	90
Πορεία για την ανάκτηση των μεταγραφικών προτύπων της FRA10AC1 και των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά από τη βάση δεδομένων GTEx και ανάλυση τους συνδυαστικά με μεθόδους πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης και εξόρυξης γνώσης.....	91

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	93
Αποτελέσματα μοριακών τεχνικών με στόχο την ανάπτυξη κλώνων κυττάρων <i>HeLa</i> υπερέκφρασης του <i>FRA10AC1</i>	93
Γονιδιωματικός έλεγχος των κλώνων κυττάρων <i>HeLa</i> που έχουν διαμολυνθεί με τον πλασμιδιακό φορέα <i>FRA10AC1</i> -pcDNA3.1/His C	93
Απομόνωση γονιδιωματικού DNA	93
Αποτελέσματα PCR για τον έλεγχο της μόλυνσης από μυκόπλασμα	95
Αποτελέσματα PCR για τον έλεγχο της ακεραιότητας του διαγονιδίου <i>FRA10AC1</i>	95
Έλεγχος της ακεραιότητας της πλασμιδιακής κατασκευής που χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση των κλώνων κυττάρων <i>HeLa</i>	98
Δημιουργία κλώνων κυττάρων <i>HeLa</i> που υπερεκφράζουν το <i>FRA10AC1</i>	101
Γραμμοποίηση πλασμιδιακού DNA	101
Επιλογή κλώνων κυττάρων <i>HeLa</i> που υπερεκφράζουν το <i>FRA10AC1</i> μετά από διαμόλυνση με το πλασμίδιο <i>FRA10AC1</i> -pcDNA3.1/His C	104
Εκτίμηση της έκφρασης του <i>FRA10AC1</i> στους κλώνους σε επίπεδο mRNA... ..	104
Έλεγχος της έκφρασης της <i>FRA10AC1</i> στους κλώνους με μικροσκόπιο φθορισμού	107
Έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης <i>FRA10AC1</i> στους κλώνους με ανοσοαποτύπωση (western blot).....	112
Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης του δικτύου άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της <i>FRA10AC1</i>	114
Επικαιροποίηση του δικτύου άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της <i>FRA10AC1</i>	114
Ανακατασκευή του επιμέρους δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της <i>FRA10AC1</i> στον πυρήνα.....	128
Ανακατασκευή των επιμέρους δικτύων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της <i>FRA10AC1</i> στο σωματίο συναρμογής	131
Διεύρυνση του δικτύου της <i>FRA10AC1</i> με δεδομένα από ορθόλογες πρωτεΐνες	134
Ανάλυση της έκφρασης των γειτόνων της <i>FRA10AC1</i>	142
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	155
Οι κλώνοι κυττάρων που είχαν παρασκευαστεί από προκαταρκτικά πειράματα φέρουν έλλειμα στο διαγονίδιο <i>FRA10AC1</i>	155
Αναπτύχθηκαν κλώνοι κυττάρων <i>HeLa</i> που υπερεκφράζουν σταθερά το <i>FRA10AC1</i>	157
Επικαιροποίηση και διερεύνηση του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της <i>FRA10AC1</i>	158
Διερεύνηση των μεταγραφικών προτύπων των πρώτων γειτόνων της <i>FRA10AC1</i>	162
Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της <i>FRA10AC1</i> παρουσιάζει σημαντική ιστοειδικότητα.....	163

Διεύρυνση του δικτύου της FRA10AC1 με δεδομένα από ορθόλογες πρωτεΐνες	164
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	166
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	167

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Στη δικτυακή βιολογία γίνεται μαθηματική μοντελοποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών των κυττάρων και των οργανισμών.	19
Εικόνα 2: Οι εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις εμφανίζονται ως ορατά κενά στα μεταφασικά χρωμοσώματα υπό ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας ή μετά από επεξεργασία με συγκεκριμένους χημικούς παράγοντες.	21
Εικόνα 3: Η εύθραυστη χρωμοσωματική θέση <i>FRA10A</i> , όπως απεικονίζεται σε οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού μετά από ανίχνευση με FISH.	23
Εικόνα 4: Το χρωμόσωμα 10 του ανθρώπου.	24
Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση του <i>FRA10AC1</i>	24
Εικόνα 6: Από τη μεταγραφή του γονιδίου <i>FRA10AC1</i> προκύπτουν 5 εναλλακτικά μετάγραφα.	25
Εικόνα 7: Από τη μετάφραση του γονιδίου <i>FRA10AC1</i> προκύπτουν 5 ισομορφές πρωτεϊνών.	26
Εικόνα 8: Η έκφραση του γονιδίου <i>FRA10AC1</i> σε διάφορους ανθρώπινους ιστούς.	26
Εικόνα 9: Γραφική αναπαράσταση της πρωτεΐνης FRA10AC1.	27
Εικόνα 10: Πείραμα επιβεβαίωσης του ρόλου του σήματος πυρηνικού εντοπισμού (αμινοξέα 223-238 και 245-262) στον εντοπισμό της πρωτεΐνης FRA10AC1 στον πυρήνα του κυττάρου.	28
Εικόνα 11: Δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης FRA10AC1 σε επίπεδο Gene ID από τη μετα-βάση PICKLE 2.2.	30
Εικόνα 12: Η εναλλακτική συναρμογή.	32
Εικόνα 13: Η διαδικασία της συναρμογής.	32
Εικόνα 14: Τα στάδια της συναρμογής και τα επιμέρους σύμπλοκα που σχηματίζονται.	34
Εικόνα 15: Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων των επιμέρους συμπλόκων του σωματίου συναρμογής (π: πρωτεΐνες, α: ακμές).	35
Εικόνα 16: Κατανομή των ορθόλογων πρωτεϊνών των FRA10AC1 και ESS2 σε διάφορους ευκαρυωτικούς μονοκύτταρους οργανισμούς και η συσχέτισή τους με τη μέση πυκνότητα ιντρονίων ανά κωδικοποιητική περιοχή 1 kb.	37
Εικόνα 17: Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1/His A, B και C.	48
Εικόνα 18: Η πλασμιδιακή κατασκευή <i>FRA10AC1</i> -pcDNA3.1/His C που χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων <i>HeLa</i>	48
Εικόνα 19: Το φασματοφωτόμετρο Quawell 5000.	50
Εικόνα 20: Αριστερά: Φυσιολογικός καρυότυπος ανδρός. Δεξιά: Ο καρυότυπος των κυττάρων <i>HeLa</i>	58
Εικόνα 21: Η διαδικασία μέτρησης των κυττάρων με τη χρήση χρωστικής trypan blue.	62
Εικόνα 22: Ο αριθμός των δειγμάτων που έχουν αναλυθεί σε κάθε ιστό στη βάση δεδομένων GTEx Portal.	85
Εικόνα 23: Στιγμιότυπο του εργαλείου Cytoscape.	87
Εικόνα 24: Στιγμιότυπο του εργαλείου TM4 / MeV (έκδοση 4.9.0).	88
Εικόνα 25: Στιγμιότυπο του εργαλείου TM4 / MeV (έκδοση 4.9.0).	89
Εικόνα 26: Η πορεία για την ανακατασκευή του δικτύου άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 και το λειτουργικό χαρακτηρισμό των πρώτων γειτόνων της.	90
Εικόνα 27: Η πορεία για τη διεύρυνση του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με δεδομένα από ορθόλογες πρωτεΐνες.	91

Εικόνα 28: Η πορεία για την ανάκτηση των μεταγραφικών προτύπων της FRA10AC1 και των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά από τη βάση δεδομένων GTEχ και ανάλυσή τους συνδυαστικά με μεθόδους πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης και εξόρυξης γνώσης.	92
Εικόνα 29: Η ηλεκτροφόρηση του απομονωμένου γονιδιωματικού DNA των κλώνων κυττάρων <i>HeLa</i> -FRAover#11, <i>HeLa</i> -FRAover#12, <i>HeLa</i> -FRAover#24, <i>HeLa</i> -FRAover#25, <i>HeLa</i> -FRAover#26 και <i>HeLa</i> -FRAover#34 και των κυττάρων ελέγχου <i>HeLa wt</i> και <i>HeLa</i> -pcDNA.	94
Εικόνα 30: Η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων PCR για την ανίχνευση του μυκοπλάσματος.	95
Εικόνα 31: Τμήμα της πλασμιδιακής κατασκευής <i>FRA10AC1</i> -pcDNA3.1HisC.	97
Εικόνα 32: Η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων PCR με τα ζεύγη εκκινητών A: F1 / R1, B: F2 / R2, Γ: F1 / R2, Δ: F-Xpress / R3.	97
Εικόνα 33: Η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων PCR με τα ζεύγη εκκινητών A: F2 / R2, B: F-Xpress / R3, Γ: F-Xpress / R1.	99
Εικόνα 34: Τμήμα της πλασμιδιακής κατασκευής <i>FRA10AC1</i> -pcDNA3.1/His C.	101
Εικόνα 35: Ηλεκτροφόρηση των πέψων <i>FRA10AC1</i> -pcDNA3.1/His C x <i>ScaI</i>	102
Εικόνα 36: Η παρασκευαστική ηλεκτροφόρηση που πραγματοποιήθηκε για την απομόνωση του γραμμοποιημένου πλασμιδίου <i>FRA10AC1</i> -pcDNA3.1/His C από το διάλυμα της πέψης.	103
Εικόνα 37: Ηλεκτροφόρηση του γραμμοποιημένου πλασμιδιακού DNA <i>FRA10AC1</i> -pcDNA3.1/His C μετά την απομόνωση από το πήκτωμα αγαρόζης της παρασκευαστικής ηλεκτροφόρησης.	103
Εικόνα 38: Τμήμα της πλασμιδιακής κατασκευής <i>FRA10AC1</i> -pcDNA3.1HisC.	106
Εικόνα 39: Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων PCR χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών F-Xpress / R1 και F2 / R2.	106
Εικόνα 40: Εικόνες από τον ανοσοεντοπισμό της πρωτεΐνης FRA10AC1 στους κλώνους.	110
Εικόνα 41: Εκτίμηση της έκφρασης της FRA10AC1 μετά από ανοσοεντοπισμό. ...	111
Εικόνα 42: Εικόνες από ανοσοαποτύπωση.	113
Εικόνα 43: Α. Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 σε επίπεδο UniProt ID. Β. Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 σε επίπεδο Gene ID.	115
Εικόνα 44: Το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1.	118
Εικόνα 45: Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1.	130
Εικόνα 46: Α. Το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με πρωτεΐνες του σωματίου συναρμογής. Β. Το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σύμπλοκο B-act του σωματίου συναρμογής. Γ. Το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σύμπλοκο C του σωματίου συναρμογής. Δ. Το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σύμπλοκο P του σωματίου συναρμογής.	134
Εικόνα 47: Α. Το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της ορθόλογης πρωτεΐνης FRA10AC1 στο είδος <i>Drosophila melanogaster</i> . Β. Το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της ορθόλογης πρωτεΐνης FRA10AC1 στο είδος <i>Mus musculus</i> . Γ. Η αλληλεπίδραση της FRA10AC1 του ανθρώπου με την Xpo1 του είδους <i>Mus musculus</i>	135
Εικόνα 48: Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 και της SPSB4 στον άνθρωπο.	137

Εικόνα 49: Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 και της RPL30 στον άνθρωπο.	138
Εικόνα 50: Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 και της RPS14 στον άνθρωπο.	139
Εικόνα 51: Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 και της XPO1 στον άνθρωπο.	140
Εικόνα 52: Το διευρυμένο δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με δεδομένα από ορθόλογες πρωτεΐνες.	141
Εικόνα 53: Γραφική αναπαράσταση των διάμεσων τιμών έκφρασης στους ιστούς των μελών του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1.	145
Εικόνα 54: Ανάλυση της έκφρασης των γειτόνων της FRA10AC1 με ιεραρχική ομαδοποίηση βάσει Ευκλείδειας απόστασης.	147
Εικόνα 55: Ιστοειδικά δίκτυα άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1. Α: Αμυγδαλή. Β: Παρεγκεφαλίδα. Γ. Ωοθήκες. Δ. Όρχεις.	150
Εικόνα 56: Το πρότυπο έκφρασης του FRA10AC1 στους 51 ιστούς.	152
Εικόνα 57: Με τη Μέθοδο Αναγνώρισης Προτύπων του Παυλίδη εντοπίστηκαν 8 γονίδια με προφίλ έκφρασης στους διάφορους ιστούς με στατιστική ομοιότητα με αυτό του FRA10AC1 (R) μεγαλύτερη από 70%.	153
Εικόνα 58: Το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 βάσει της στατιστικής ομοιότητας που παρουσιάζουν τα προφίλ έκφρασης των γονιδίων στους διάφορους ιστούς.	154
Εικόνα 59: Εικόνες από τον ανοσοεντοπισμό της πρωτεΐνης FRA10AC1 σε κύτταρα ελέγχου <i>HeLa</i> wt και <i>HeLa</i> -pcDNA και στον κλώνο κυττάρων <i>HeLa</i> -FRAover#25.	156
Εικόνα 60: Οι κλώνοι κυττάρων που παρουσίασαν αυξημένη έκφραση του <i>FRA10AC1</i> σε επίπεδο mRNA βάσει της τεχνικής RT-PCR και σε επίπεδο πρωτεΐνης βάσει των πειραμάτων ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης.	157
Εικόνα 61: Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 σε επίπεδο UniProt ID από την PICKLE 2.5.	159

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Τα αποτελέσματα της αναζήτησης στην GWAS catalog χρησιμοποιώντας τον όρο “FRA10AC1”.	39
Πίνακας 2: Οι συνιστώμενες ποσότητες διαλυμάτων, ανάλογα με το δοχείο καλλιέργειας.....	61
Πίνακας 3: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR.....	72
Πίνακας 4: Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης.	76
Πίνακας 5: Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης Western.	76
Πίνακας 6: Στατιστικά στοιχεία της βάσης δεδομένων GTEx Portal.....	85
Πίνακας 7: Τα αποτελέσματα της φασματοφωτομέτρησης του διαλύματος απομονωμένου DNA των κλώνων κυττάρων <i>HeLa</i> -FRAover#11, <i>HeLa</i> -FRAover#12, <i>HeLa</i> -FRAover#24, <i>HeLa</i> -FRAover#25, <i>HeLa</i> -FRAover#26 και <i>HeLa</i> -FRAover#34 και των κυττάρων ελέγχου <i>HeLa wt</i> και <i>HeLa</i> -pcDNA.	94
Πίνακας 8: Η συγκέντρωση και ο λόγος καθαρότητας των διαλυμάτων RNA που απομονώθηκαν από τους κλώνους.....	105
Πίνακας 9: Η συγκέντρωση πρωτεϊνών στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κλώνων. ...	112
Πίνακας 10: Λειτουργικός χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά άμεσα η FRA10AC1, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων UniProt.....	116
Πίνακας 11: Ο υποκυττάριος εντοπισμός των μελών του δικτύου της FRA10AC1.	129
Πίνακας 12: Η συμμετοχή των μελών του δικτύου της FRA10AC1 στα επιμέρους σύμπλοκα του σωματίου συναρμογής.	132
Πίνακας 13: Αντιστοίχιση των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά άμεσα η ορθόλογη της FRA10AC1 σε άλλους οργανισμούς με τις ορθόλογες στον άνθρωπο.	136
Πίνακας 14: Ανάλυση των δεδομένων έκφρασης των γονιδίων ως προς τη μέγιστη και ελάχιστη τιμή, το μέσο όρο, τη διάμεσο και το συντελεστή διακύμανσης.	143
Πίνακας 15: Τα γονίδια με τα οποία ομαδοποιείται το <i>FRA10AC1</i> βάσει της Μεθόδου Ανάλυσης Προτύπων (Pavlidis Template Matching) με όριο ομοιότητας 0.7.....	151

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μοριακή φαινοτύπηση του βιολογικού ρόλου γονιδίων συνδυάζοντας μοριακές τεχνικές με εργαλεία βιοπληροφορικής

Η διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου ενός γονιδίου μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας μοριακές τεχνικές ή με την αξιοποίηση των ήδη υπαρχόντων δεδομένων και την επεξεργασία τους με εργαλεία βιοπληροφορικής για την εξαγωγή νέας γνώσης. Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε το γονίδιο *FRA10AC1* μοριακά χρησιμοποιώντας κυτταροκαλλιέργεια στην οποία έγινε διατάραξη της έκφρασης του γονιδίου και βιοπληροφορικά μελετώντας το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της παραγόμενης πρωτεΐνης και δεδομένα έκφρασης σε ανθρώπινους ιστούς.

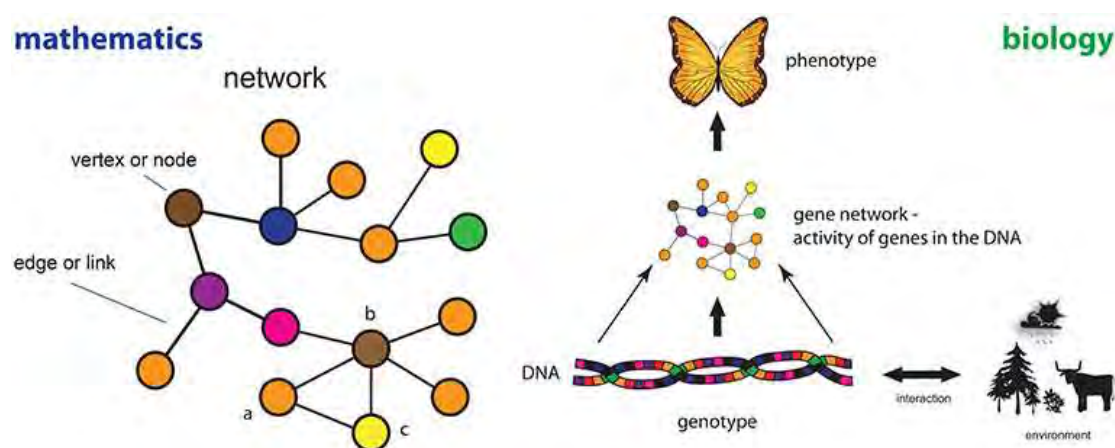
Η μελέτη σε κυτταροκαλλιέργεια επιλέγεται ευρέως λόγω των σημαντικών πλεονεκτημάτων που φέρει έναντι της χρήσης πειραματοζώων, όπως είναι η ευκολία χειρισμού, το μειωμένο κόστος και η έλλειψη ηθικών ζητημάτων (Kaur & Dufour, 2012). Συνήθως μελετώνται κύτταρα στα οποία έχει γίνει καταστολή της έκφρασης του γονιδίου με τη χρήση RNAi (Hammond, et al., 2000) ή κύτταρα που υπερεκφράζουν το γονίδιο, το οποίο έχει εντεθεί μαζί με έναν υποκινητή ισχυρής έκφρασης (Liu, et al., 2018). Επιπλέον, η κυτταροκαλλιέργεια δίνει τη δυνατότητα χρήσης ομικών αναλύσεων για τη διερεύνηση της φυσιολογίας των κυττάρων.

Από την άλλη, η είσοδος της βιοπληροφορικής στον τομέα της μοριακής βιολογίας και γενετικής έχει δώσει σημαντική ώθηση στην ανάπτυξη και προώθηση της γνώσης. Αρχικά, η διαθέσιμη γνώση συλλέχθηκε σε βάσεις δεδομένων και είναι πλέον ευρέως προσβάσιμη. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί πολλά βιοπληροφορικά εργαλεία που επιτρέπουν την ταυτόχρονη επεξεργασία και παρουσίαση μεγάλου όγκου πληροφοριών, συμβάλλοντας στην εξαγωγή νέων βιολογικών υποθέσεων και συμπερασμάτων.

Έως πρόσφατα, οι περισσότερες μελέτες γίνονταν αναγωγικά, εστιάζοντας στη μελέτη της λειτουργίας ενός μεμονωμένου μορίου ή συστατικού. Ωστόσο, γνωρίζουμε ότι ένας φαινότυπος συνιστά ένα σύστημα βιομοριακών αλληλεπιδράσεων και σχετιζόμενων βιολογικών διεργασιών στο πλαίσιο ενός πολύπλοκου δικτύου. Οπότε, η τροποποίηση της έκφρασης ενός γονιδίου δεν αναμένεται να επηρεάσει μεμονομένα αυτό και την αφθονία των άμεσων προϊόντων του, αλλά μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό περισσότερα τμήματα του δικτύου της κυτταρικής φυσιολογίας (Oltvai, 2002). Μια βασική πρόκληση για τη βιολογία στον εικοστό πρώτο αιώνα είναι να κατανοηθεί η δομή και η δυναμική του πολύπλοκου διακυτταρικού δικτύου των αλληλεπιδράσεων,

που συμβάλλουν στη δομή και τη λειτουργία ενός ζωντανού κυττάρου (Barabási & Oltvai, 2004).

Η συμπεριφορά των σύνθετων συστημάτων, όπως το κύτταρο, προκύπτει από την ενορχηστρωμένη δραστηριότητα των συστατικών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Στη δικτυακή βιολογία γίνεται αναπαράσταση του συστήματος με μαθηματική μοντελοποίηση, όπου τα συστατικά μπορούν να αναπαρασταθούν με μια σειρά από κόμβους (nodes) που συνδέονται μεταξύ τους με ακμές (edges), με κάθε ακμή να αντιπροσωπεύει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο κόμβων. Οι κόμβοι και οι ακμές σχηματίζουν ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 1) (Barabási & Oltvai, 2004).



Εικόνα 1: Στη δικτυακή βιολογία γίνεται μαθηματική μοντελοποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών των κυττάρων και των οργανισμών. Τα συστατικά αναπαριστώνται με κόμβους (nodes) που συνδέονται μεταξύ τους με ακμές (edges), οι οποίες αναπαριστούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο συστατικών. Πηγή: <https://kids.frontiersin.org/article/10.3389/frym.2019.00049>

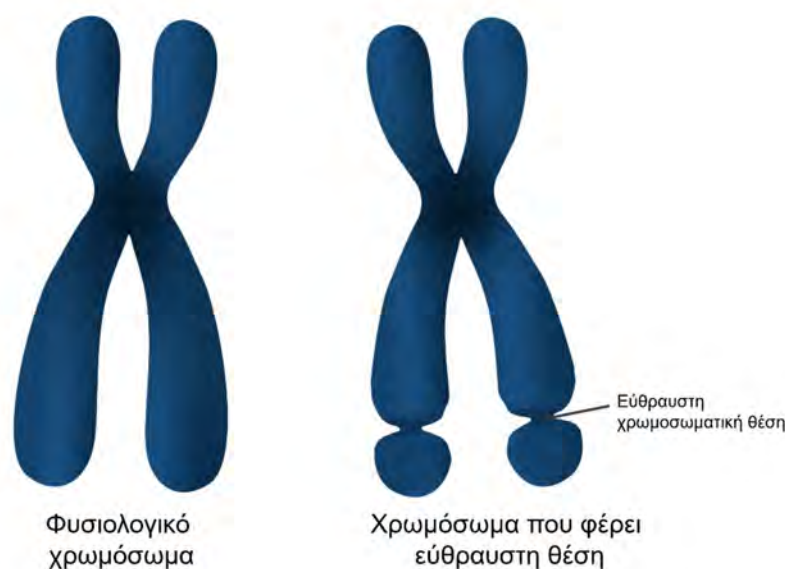
Η μελέτη των δικτύων είναι πολύ σημαντική, αφού όλα τα μόρια αποτελούν μέρος ενός πολύπλοκου δικτύου και αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια. Ακόμη και αν δεν είναι γνωστός ο βιολογικός ρόλος ενός μορίου, η εύρεση της θέσης του στο δίκτυο, δηλαδή των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρά και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός αυτών, μπορεί να οδηγήσει στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το ρόλο του. Επιπλέον, η σύνδεση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από τη μοριακή ανάλυση του γονιδίου με τα αποτελέσματα που εξάγονται από την ανάλυση του δικτύου στο οποίο αυτό βρίσκεται οδηγεί σε αλληλοεπιβεβαίωση και εξαγωγή ακόμη πιο αξιόπιστων συμπερασμάτων.

Διερευνώντας τη μοριακή βάση της εύθραυστης χρωμοσωματικής θέσης *FRA10A* ταυτοποιήθηκε ως υπεύθυνο το γονίδιο *FRA10AC1*. Με στόχο τη λειτουργική ανάλυση του γονιδίου έχει γίνει ανάπτυξη κλώνων κυττάρων *HeLa* στα οποία έχει γίνει καταστολή της έκφρασης του γονιδίου και μελέτη της φυσιολογίας τους με συνδυαστική ομική ανάλυση. Στόχος της παρούσας διπλωματικής είναι η μοριακή μελέτη του γονιδίου μέσω της ανάπτυξης κλώνων κυττάρων *HeLa* που υπερεκφράζουν το *FRA10AC1*, καθώς και η βιοπληροφορική ανάλυση του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με εργαλεία δικτυακής βιολογίας και πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης ομικών δεδομένων.

Ο βιολογικός ρόλος του *FRA10AC1*

Η εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A*

Ως εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις ορίζονται κενά ή ασυνέχειες στη χρωμοσωματική δομή που παρατηρούνται κυτταρογενετικά σε παρασκευάσματα μεταφασικών κυττάρων, που καλλιεργούνται υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Εικόνα 2). Σήμερα έχουν εντοπιστεί πάνω από 100 εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις. Οι εύθραυστες θέσεις δεν είναι εμφανείς γενικά σε καλλιεργημένα κύτταρα, αλλά σχηματίζουν ορατά κενά και θραύσματα στα μεταφασικά χρωμοσώματα υπό ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας ή μετά από επεξεργασία με συγκεκριμένους χημικούς παράγοντες (Durkin & Glover, 2007).



Εικόνα 2: Οι εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις εμφανίζονται ως ορατά κενά στα μεταφασικά χρωμοσώματα υπό ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας ή μετά από επεξεργασία με συγκεκριμένους χημικούς παράγοντες. Πηγή: yourgenome, (2017). Copyright information. [online] Available at: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-fragile-x-syndrome> [Accessed 8 Aug. 2020].

Οι εύθραυστες θέσεις ταξινομούνται σε συνήθεις και σπάνιες με βάση τη συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό. Οι συνήθεις εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις εντοπίζονται στα χρωμοσώματα όλων των ανθρώπων και αποτελούν συστατικό της δομής των φυσιολογικών χρωμοσωμάτων. Οι σπάνιες εύθραυστες θέσεις, οι οποίες παρατηρούνται σε λιγότερο από το 5% των ατόμων, διαχωρίζονται περαιτέρω βάσει του προτύπου κληρονομής και η αυξημένη συχνότητα θραύσης σε αυτές τις θέσεις προκαλείται συνήθως από την επέκταση νουκλεοτιδικών επαναλήψεων (Durkin & Glover, 2007).

Ο μοριακός μηχανισμός δημιουργίας των σπάνιων εύθραυστων χρωμοσωματικών θέσεων στηρίζεται στην καθυστερημένη αντιγραφή των περιοχών αυτών. Συγκεκριμένα, στις σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις, ο μεγάλος αριθμός επαναλήψεων CGG και περιοχές πλούσιες σε A και T σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές, όπως φουρκέτες, που εμποδίζουν την επέκταση της διχάλας της αντιγραφής (Lukusa & Fryns, 2008).

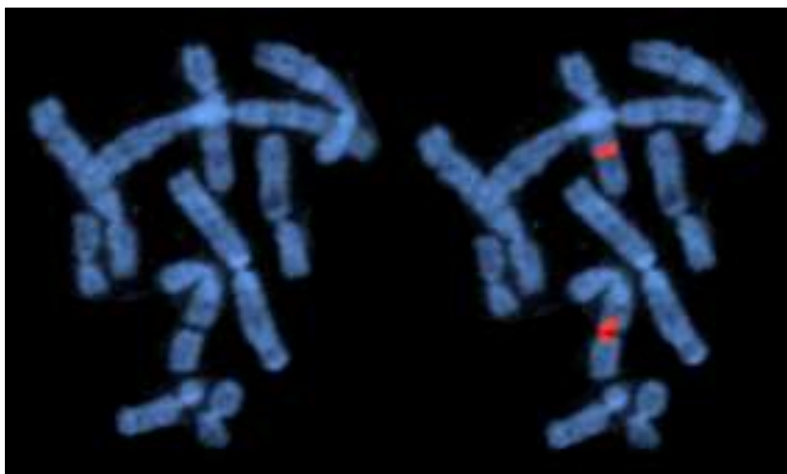
Μια σημαντική κατηγορία σπάνιων εύθραυστων χρωμοσωματικών θέσεων παρατηρείται κυτταρογενετικά σε παρασκευάσματα μεταφασικών κυττάρων που καλλιεργούνται απουσία φυλλικού οξέος. Το φυλλικό οξύ επηρεάζει το ρυθμό της αντιγραφής του DNA, καθώς συμμετέχει στο βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης των πουρινών και των πυριμιδινών, χωρίς να αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Lukusa & Fryns, 2008). Αυτό, σε συνδυασμό με τις δευτεροταγείς δομές που σχηματίζονται στην περιοχή, εμποδίζει τη συσπείρωση της χρωματίνης που παραμένει σε αποσυσπειρωμένη μορφή και απεικονίζεται κυτταρογενετικά ως ασυνέχεια (εύθραυστη θέση) σε συγκεκριμένα σημεία των χρωμοσωμάτων (Jiang, et al., 2009).

Το φυλλικό οξύ, με τη μορφή 5,10-μεθυλενο-THF, δίνει μια ομάδα μεθυλίου στην ουρακίλη, μετατρέποντάς τη σε θυμίνη, η οποία χρησιμοποιείται για τη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA. Η έλλειψη του φυλλικού οξέος μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη ενσωμάτωση ουρακίλης στο DNA. Καθώς το κύτταρο προσπαθεί να επιδιορθώσει το λάθος, διασπά το μόριο του DNA για να εξάγει την ουρακίλη. Εάν το φυλλικό οξύ είναι συνεχώς περιορισμένο, εμφανίζεται αστάθεια του DNA, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε δίκλωνες θραύσεις του (Susan, et al., 2002).

Η *FRA10A* που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10 του ανθρώπου ταξινομείται στις σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις και εμφανίζεται μετά από καλλιέργεια κυττάρων απουσία φυλλικού οξέος (Εικόνα 3). Η μοριακή βάση εμφάνισής της είναι η επέκταση της τρινουκλεοτιδικής επανάληψης της αλληλουχίας CGG που βρίσκεται στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *FRA10AC1*. Η γονοτυπική ανάλυση σε 81 μη συγγενή άτομα από 38 οικογένειες αναφοράς CEPH (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain) έδειξε ότι η τρινουκλεοτιδική επανάληψη (CGG)_n στο γονίδιο *FRA10AC1* είναι πολυμορφική με τέσσερα φυσιολογικά αλληλόμορφα στον πληθυσμό, με 8, 9, 10 και 14 επαναλήψεις CGG. Το αλληλόμορφο (CGG)₉ είναι το συνηθέστερο και η συχνότητα ετεροζυγωτίας στο γενικό πληθυσμό είναι 47%. Η πολυμορφικότητα της τρινουκλεοτιδικής επανάληψης (CGG)_n αποτελεί ένδειξη δυνητικής επέκτασής της. Γονοτυπική ανάλυση της επανάληψης σε φορείς της

FRA10A έδειξε ότι στα άτομα αυτά είχε γίνει δραματική επέκταση της αλληλουχίας, καθώς έφεραν πάνω από 200 επαναλήψεις CGG, με αποτέλεσμα να υπερμεθυλιώνεται η περιοχή και να καταστέλλεται η έκφραση του γονιδίου *FRA10AC1* (Sarafidou, et al, 2004).

Η *FRA10A* ακολουθεί επικρατές πρότυπο κληρονόμησης και εντοπίζεται στον πληθυσμό με συχνότητα εμφάνισης 1 στα 500 άτομα. Οι φορείς της *FRA10A* παρουσιάζουν ήπια διανοητική και αναπτυξιακή καθυστέρηση (Sarafidou, et al, 2004).



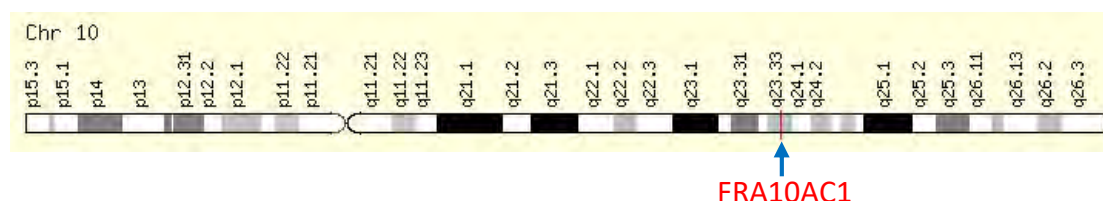
Εικόνα 3: Η εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A*, όπως απεικονίζεται σε οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού μετά από ανίχνευση με FISH. Πηγή: Sarafidou, et al, 2004

Το γονίδιο *FRA10AC1*

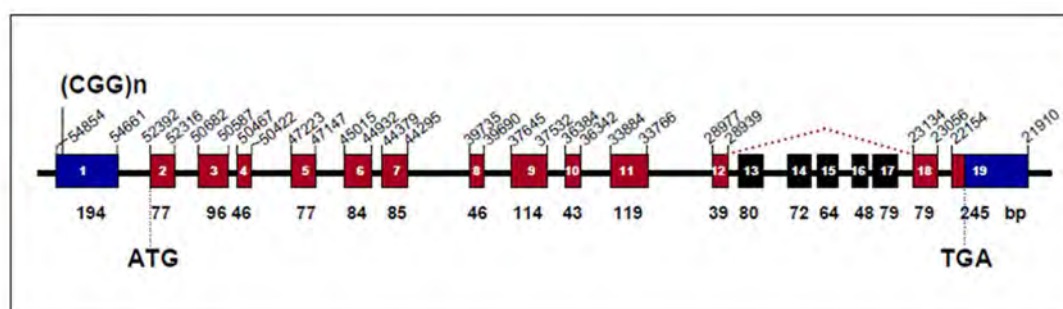
Το γονίδιο *FRA10AC1* εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 10 του ανθρώπου, στη θέση 10q23.33, ανάμεσα στα γονίδια *PDE6C* και *LGII*. Στην Εικόνα 4 παρουσιάζεται η θέση του *FRA10AC1* στο χρωμόσωμα 10 του ανθρώπου μετά από αναζήτηση στη βάση δεδομένων GeneCards. Το γονίδιο χαρτογραφήθηκε στο πλαίσιο της αλληλούχησης της περιοχής q23.3-q25.1 του χρωμοσώματος 10 του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, χαρτογραφήθηκε ως υπεύθυνο για την εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A*, που επάγεται μετά από καλλιέργεια κυττάρων απουσία φυλλικού οξέος (Σαραφίδου, Διδακτορική Διατριβή, 2005).

Το γονίδιο *FRA10AC1* έχει μήκος περίπου 35 kbp, φέρει δεκατέσσερα (14) κύρια εξόνια (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 19) και πέντε (5) εξόνια (13, 14, 15, 16, 17) που χρησιμοποιούνται στην εναλλακτική συναρμογή. Όλες οι θέσεις συναρμογής φέρουν τη συντηρημένη αλληλουχία AG / GT. Η μεταγραφή του γονιδίου γίνεται από το τελομερές προς το κεντρομερές του χρωμοσώματος. Το κωδικόνιο έναρξης (ATG)

εντοπίζεται στη θέση 195 bp στο εξόνιο 2 του cDNA του κύριου μεταγράφου που παράγεται και το κωδικόνιο λήξης (TGA) εντοπίζεται στο εξόνιο 19, στη θέση 1140bp. Η τρινουκλεοτιδική επανάληψη (CGG)_n που επεκτείνεται στους φορείς της *FRA10A* εντοπίζεται στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου (Εικόνα 5) (Σαραφίδου, Διδακτορική Διατριβή, 2005).



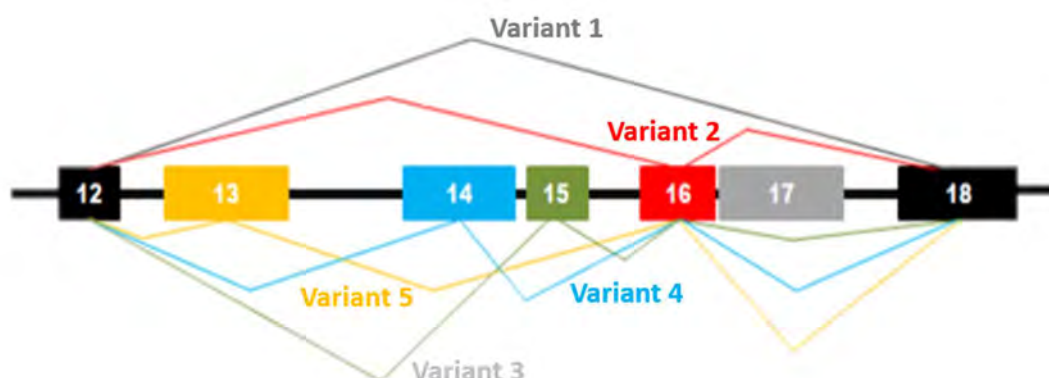
Εικόνα 4: Το χρωμόσωμα 10 του ανθρώπου. Με το βέλος υποδεικνύεται η θέση του γονιδίου *FRA10AC1* στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 10 του ανθρώπου (10q23.33). Πηγή: Διαδικτυακή διεπαφή της βάσης δεδομένων GeneCards (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FRA10AC1>)



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση του *FRA10AC1*. Με μπλε παρουσιάζονται οι 3' και 5' αμετάφραστες περιοχές του γονιδίου, με κόκκινο τα κύρια εξόνια που συμμετέχουν στη συναρμογή του κύριου προϊόντος και όλων των εναλλακτικών μεταγράφων, ενώ με μαύρο χρώμα τα εξόνια που συμμετέχουν εναλλάξ στη συναρμογή των μη κύριων μεταγράφων που είναι γνωστά (εναλλακτικά μετάγραφα 2, 3, 4 και 5). Πηγή: Διαδικτυακή διεπαφή της βάσης δεδομένων GeneCards (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FRA10AC1>)

Το κύριο μετάγραφο 1 έχει μήκος 1344 bp και εκφράζεται καθολικά (δηλαδή σε όλους τους ιστούς). Εφαρμόζοντας RT-PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που υβριδοποιούνται στα εξόνια 11 και 19, ανιχνεύθηκε άλλο ένα μετάγραφο (εναλλακτικό μετάγραφο 2) που φέρει επιπλέον το εξόνιο 16, το οποίο επίσης εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, σε μικρότερο ωστόσο βαθμό από το κύριο μετάγραφο 1. Τα μετάγραφα 3, 4 και 5 φέρουν τα εξόνια 1-12, 16 και 18-19 και επιπλέον τα εξόνια 15, 14 και 13 αντίστοιχα. Τα μετάγραφα αυτά έχουν εντοπιστεί μόνο στις γονάδες, ενώ σύμφωνα με τη Σαραφίδου (2005), είναι πιθανό βάσει αλληλουχιών ESTs να υπάρχει τουλάχιστον

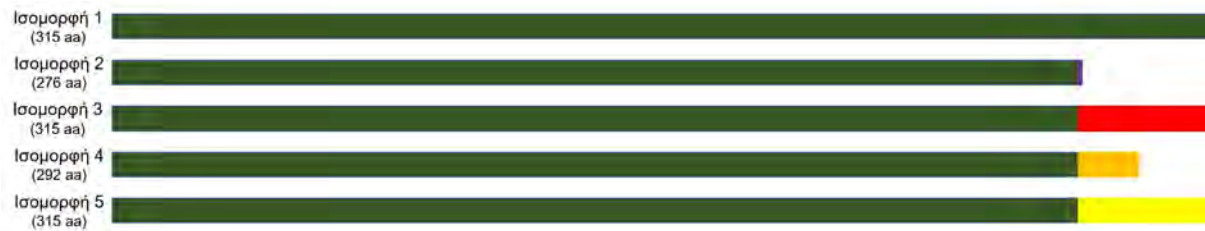
ένα ακόμη μετάγραφο που φέρει το εξόνιο 17, το οποίο όμως λόγω της χαμηλής έκφρασής του δεν μπόρεσε να εντοπιστεί (Εικόνα 6) (Σαραφίδου, Διδακτορική Διατριβή, 2005).



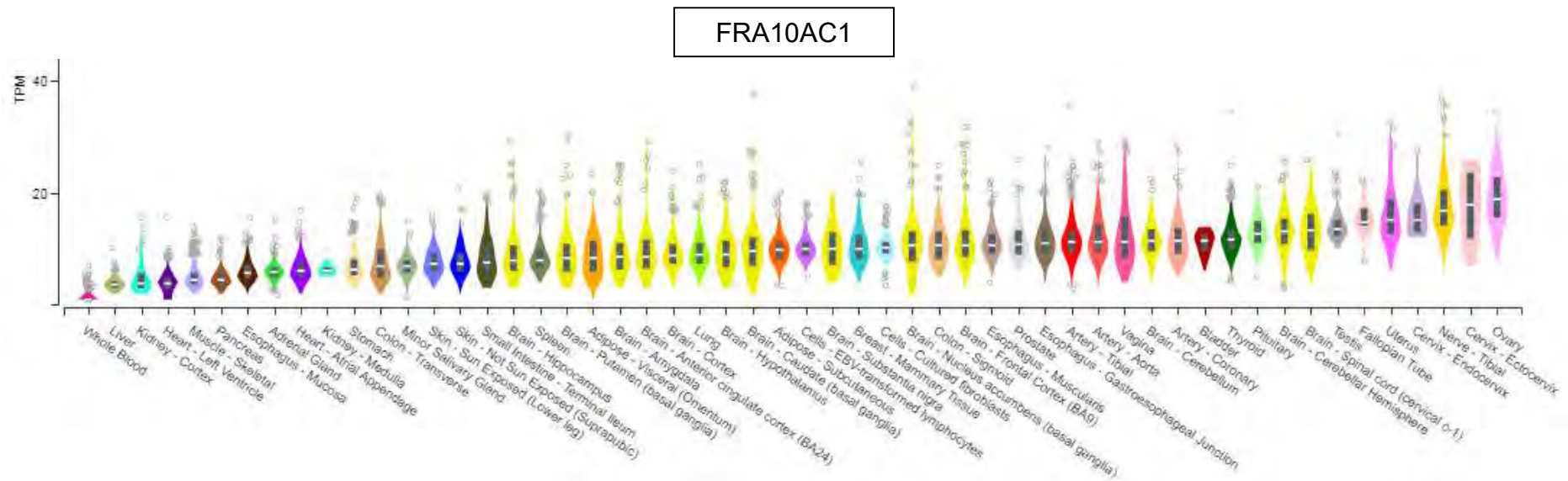
Εικόνα 6: Από τη μεταγραφή του γονιδίου *FRA10AC1* προκύπτουν 5 εναλλακτικά μετάγραφα. Το κύριο μετάγραφο είναι το 1 εκφράζεται σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς. Το μετάγραφο 2 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, αλλά σε μικρότερο βαθμό από το μετάγραφο 1. Τα μετάγραφα 3, 4 και 5 έχουν εντοπιστεί μόνο στις γονάδες.

Οι διαφορετικές ισομορφές των πρωτεϊνών που παράγονται από τα εναλλακτικά μετάγραφα φέρουν την ίδια αλληλουχία στο μεγαλύτερο τμήμα τους και παρουσιάζουν σημαντική ετερογένεια στο καρβοξυτελικό άκρο (Εικόνα 7). Η παρουσία επιπλέον μεταγράφων στον ιστό των όρχεων συνάδει με παλαιότερες μελέτες που έχουν δείξει ότι στον ιστό αυτό εντοπίζονται πολυάριθμα εναλλακτικά μετάγραφα, πιθανώς λόγω της λεπτής ρύθμισης που γίνεται στα γονίδια, προκειμένου να λάβουν χώρα ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των γαμετικών κυττάρων (Xu, et al., 2002). Επιπλέον, η πρωτεΐνη FRA10AC1 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην εναλλακτική συναρμογή στο *Chlamydomonas reinhardtii* (Lin, et al., 2018), επομένως η παρουσία επιπλέον ισομορφών στον ιστό των όρχεων πιθανώς συμβάλει επίσης στην επίτευξη της παραγωγής πολλαπλών μεταγράφων από άλλα γονίδια.

Από τη βάση δεδομένων GTEx portal που παρέχει μεταγραφομικά δεδομένα ανθρώπινων ιστών (Carithers & Moore, 2015), προκύπτει ότι το FRA10AC1 είναι μεταγραφικά ενεργό σε όλους τους ιστούς και παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε μεταγραφικά ενεργούς ιστούς, όπως είναι το κνημιαίο νεύρο, τα γεννητικά όργανα και των δύο φύλων και ο θυρεοειδής. Τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης εντοπίζονται στην καρδιά, στο ήπαρ, το νεφρό και τα μυϊκά κύτταρα (Εικόνα 8). Στο ανθρώπινο γονιδίωμα δεν έχουν εντοπιστεί παράλογα γονίδια του *FRA10AC1*.



Εικόνα 7: Από τη μετάφραση του γονιδίου *FRA10AC1* προκύπτουν 5 ισομορφές πρωτεϊνών. Με σκούρο πράσινο χρώμα σημαίνεται η περιοχή που είναι κοινή σε όλες τις ισομορφές. Οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν σημαντική ετερογένεια στο καρβοξυτελικό άκρο. Πηγή: Διαδικτυακή διεπαφή της βάσης δεδομένων UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q70Z53>)



Εικόνα 8: Η έκφραση του γονιδίου *FRA10AC1* σε διάφορους ανθρώπινους ιστούς. Πηγή: Διαδικτυακή διεπαφή της βάσης δεδομένων GTEx Portal (<https://www.gtexportal.org/home/gene/FRA10AC1>)

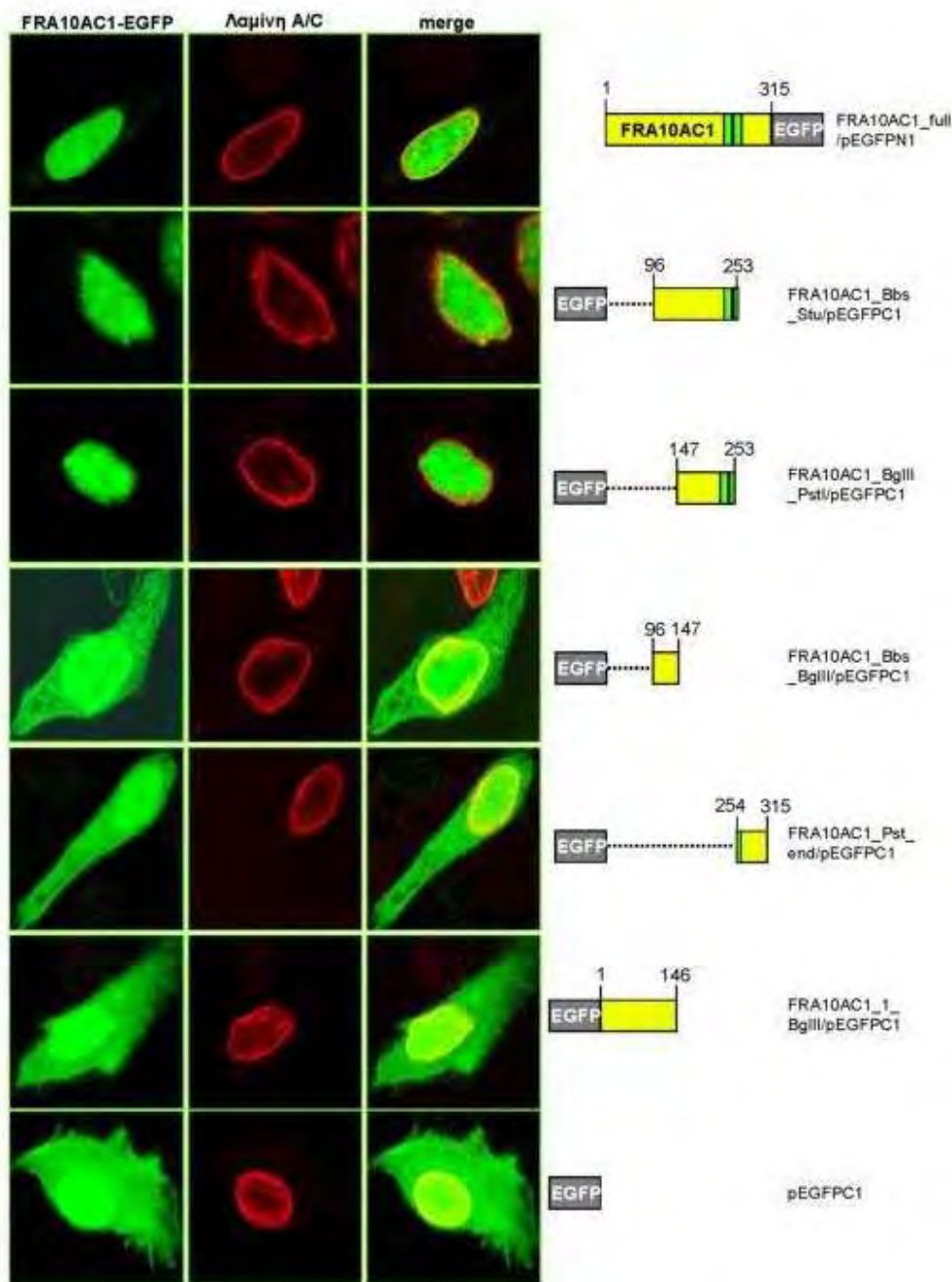
Η πρωτεΐνη FRA10AC1

Η πρωτεΐνη FRA10AC1 έχει μέγεθος 315 αμινοξέα, μοριακό βάρος 37,55 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο (pI) 8,25. Το πολυπεπτίδιο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε λυσίνη (15,2%) και γλουταμινικό οξύ (12,7%). Η περιοχή των αμινοξέων 200-275 είναι η πιο αλκαλική περιοχή της πρωτεΐνης, με pI 10.0, ενώ η πιο όξινη περιοχή είναι το καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 271-315 και έχει pI 3,7 (Σαραφίδου, Διδακτορική Διατριβή, 2005).

Η ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας δείχνει ότι η πρωτεΐνη δε φέρει συντηρημένες αλληλουχίες που να υποδεικνύουν πληροφορίες σχετικά με το βιοχημικό ρόλο της, ωστόσο, έχει ταυτοποιηθεί ένα διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 223-238 και 245-262 (Εικόνα 9). Το σήμα αυτό είναι υπεύθυνο για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στον πυρήνα των κυττάρων. Σε πειράματα ανοσοενοπισμού της πρωτεΐνης λαμβάνεται σήμα μόνο στον πυρήνα -εξαιρουμένων των πυρηνίσκων- ενώ η αφαίρεση του σήματος πυρηνικού εντοπισμού οδηγεί σε διάχυτο εντοπισμό της πρωτεΐνης και στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου (Εικόνα 10) (Σαραφίδου, Διδακτορική Διατριβή, 2005). Χρησιμοποιώντας το εργαλείο βιοπληροφορικής Smart (Letunic & Bork, 2017) εντοπίστηκαν τρεις περιοχές χαμηλής πολυπλοκότητας (αμινοξέα 223-238, 246-273, 278-288). Οι περιοχές αυτές παρουσιάζουν ελάχιστη ποικιλομορφία ως προς την αμινοξική τους αλληλουχία και οι μελέτες δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες που τις φέρουν τείνουν να κάνουν περισσότερες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις σε σχέση με άλλες πρωτεΐνες (Coletta, et al., 2010). Εφαρμόζοντας πειράματα συγκατακρήμνισης προέκυψε ότι οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της FRA10AC1 με άλλα πολυπεπτίδια γίνονται μέσω της περιοχής των αμινοξέων 96-253 (Σαραφίδου, Διδακτορική Διατριβή, 2005).



Εικόνα 9: Γραφική αναπαράσταση της πρωτεΐνης FRA10AC1. Η πρωτεΐνη αποτελείται από 315 αμινοξέα και περιέχει ένα διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), που αποτελείται από τα αμινοξέα 223-238 και 245-262. Πηγή: Σαραφίδου, Διδακτορική Διατριβή, 2005



Εικόνα 10: Πείραμα επιβεβαίωσης του ρόλου του σήματος πυρηνικού εντοπισμού (αμινοξέα 223-238 και 245-262) στον εντοπισμό της πρωτεΐνης FRA10AC1 στον πυρήνα του κυττάρου. Δεξιά αναγράφονται και παρουσιάζονται σχηματικά τα τμήματα της πρωτεΐνης (κίτρινο) που παράγονται από το διαγονίδιο που ενσωματώθηκε στα κύτταρα και το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (πράσινο). Παρατηρείται ότι όταν απουσιάζει το σήμα πυρηνικού εντοπισμού από το διαγονίδιο, τότε το παραγόμενο πολυπεπτίδιο εντοπίζεται διάχυτο και στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Στην τελευταία σειρά παρουσιάζονται οι εικόνες ανοσοφθορισμού των κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί μόνο με τον πλασμιδιακό φορέα (αρνητικός έλεγχος). Πηγή: Σαραφίδου, Διδακτορική Διατριβή, 2005

Στο πολυπεπτίδιο που παράγεται από την έκφραση του *FRA10AC1* εντοπίζονται πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης, κυρίως στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου. Η ισομορφή που παράγεται από το κύριο μετάγραφο 1 έχει στο καρβοξυτελικό άκρο πέντε πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης σε σερίνη και μία σε τυροσίνη, ενώ οι ισομορφές που παράγονται από τα μετάγραφα 3 και 5 έχουν μία και δύο πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης σε σερίνη αντίστοιχα. Επίσης, έχει ταυτοποιηθεί μία πιθανή θέση σουμοϋλίωσης στη λυσίνη 91 (Σαραφίδου, Διδακτορική Διατριβή, 2005).

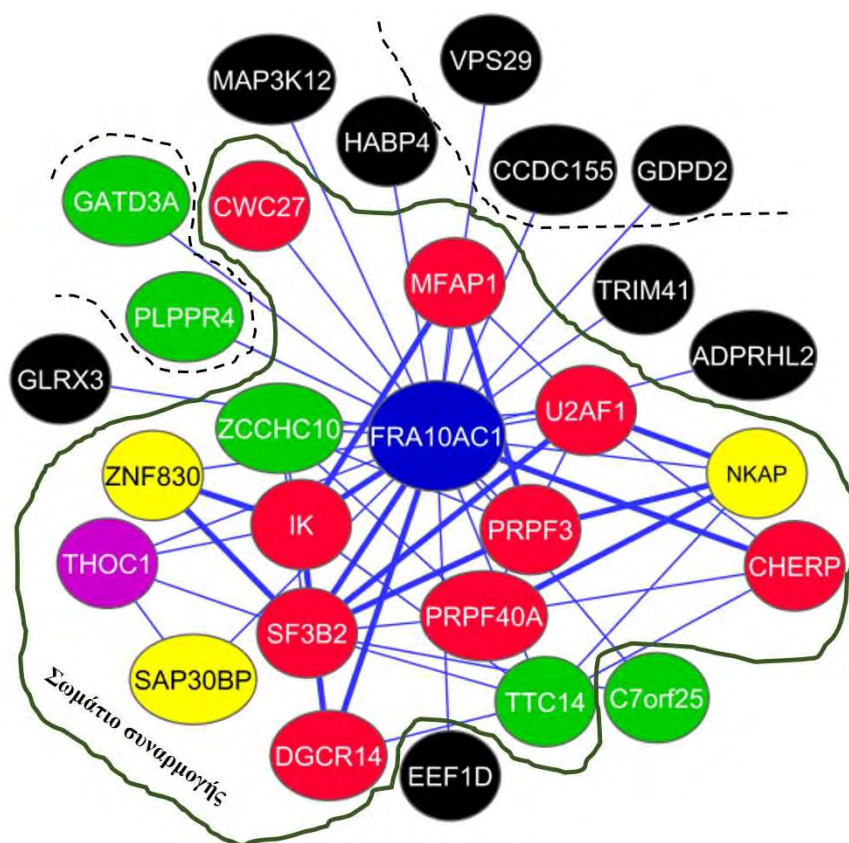
Η πρωτεΐνη *FRA10AC1* παρουσιάζει καθολική έκφραση στον άνθρωπο και έχουν εντοπιστεί ορθόλογες πρωτεΐνες σε όλους τους ευκαρυωτικούς πολυκύτταρους οργανισμούς και σε ορισμένους μονοκύτταρους. Η ορθόλογη πρωτεΐνη του είδους *Pan troglodytes* παρουσιάζει 99% ομολογία με την ανθρώπινη, του ποντικού παρουσιάζει ομολογία 92%, της *Drosophila melanogaster* 43%, του *Caenorhabditis elegans* 36%, ενώ οι ομόλογες πρωτεΐνες στο φυτικό βασίλειο των ειδών *Arabidopsis thaliana* και *Pimpinella brachycarpa* παρουσιάζουν ομολογία 34% και 41% αντίστοιχα. Το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας (45-67%) ανάμεσα στα ορθόλογα μόρια παρατηρείται στην κεντρική περιοχή (αμινοξέα 105-240 στο πολυπεπτίδιο του ανθρώπου) και ταυτίζεται σχεδόν με την περιοχή των αμινοξέων που είναι υπεύθυνη για τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της *FRA10AC1*. Η υψηλή συντήρηση της περιοχής αυτής πιθανώς υποδηλώνει τη σημαντικότητά της στην επίτευξη μιας λειτουργίας (Σαραφίδου, Διδακτορική Διατριβή, 2005).

Ο βιοχημικός ρόλος της *FRA10AC1* παραμένει άγνωστος και καμία από τις ορθόλογες πρωτεΐνες δεν έχει μελετηθεί ακόμη λειτουργικά. Είναι γνωστό, ωστόσο, ότι αποτελεί συστατικό του σωματίου συναρμογής, εφόσον έχει απομονωθεί ως συστατικό του ολικού σωματίου και των επιμέρους συμπλόκων B-act, C και P (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018, Hegele, et al., 2012) και παίζει ρόλο στην αναγνώριση εναλλακτικών θέσεων συναρμογής στο φύκος *Chlamydomonas reinhardtii* (Lin, et al., 2018).

Η πλειονότητα των πρώτων γειτόνων της *FRA10AC1* είναι συστατικά του σωματίου συναρμογής

Η ανακατασκευή του δικτύου άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της *FRA10AC1* χρησιμοποιώντας τη μετα-βάση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στον άνθρωπο PICKLE σε επίπεδο GeneID (PICKLE 2.2, www.pickle.gr, Klapa, et al., 2013,

Gioutlakis, et al., 2017) προσδιόρισε 27 πρωτεΐνες, από τις οποίες οι 15 αφορούν σε συστατικά του σωματίου συναρμογής (περικλείονται με συνεχή πράσινη γραμμή). Σε αυτές περιλαμβάνονται παράγοντες συναρμογής (PRPF3, PR40A, CWC27, IK, SF3B2, MFAP1, CHERP, U2AF1, U2AF5, ESS2), μεταγραφικοί παράγοντες (ZNF830, SAP30BP, NKAP) και μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στην έξοδο του mRNA από τον πυρήνα (THOC1). Επιπλέον, η FRA10AC1 αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε λειτουργίες εκτός της επεξεργασίας του mRNA (υποδεικνύονται με μαύρο κόμβο) και πρωτεΐνες που έχουν άγνωστη λειτουργία (υποδεικνύονται με πράσινο κόμβο). Οι 22 από τις 27 πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά άμεσα η FRA10AC1 εντοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου (Εικόνα 11) (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018).



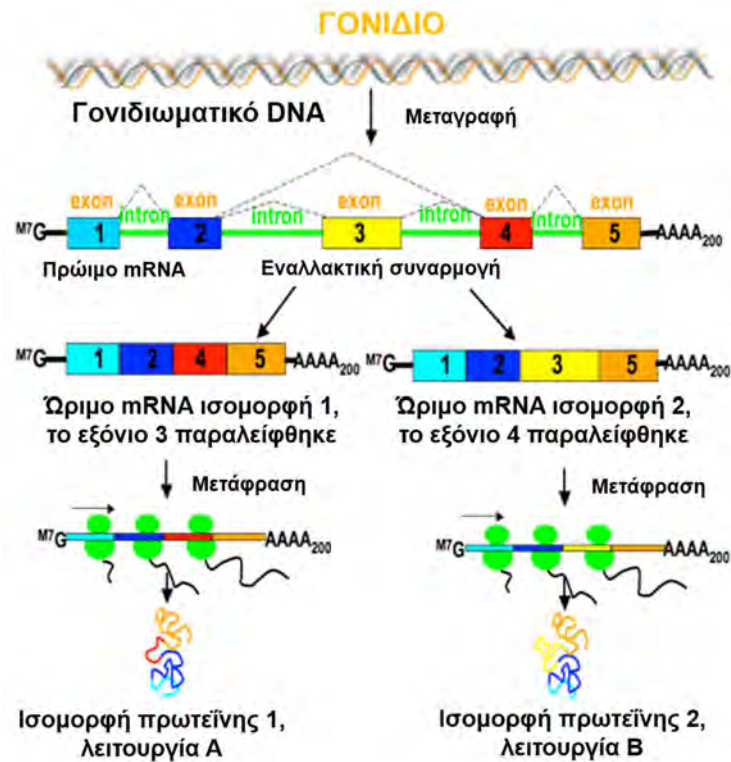
Εικόνα 11: Δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης FRA10AC1 σε επίπεδο Gene ID από τη μετα-βάση PICKLE 2.2. Το δίκτυο περιλαμβάνει 27 πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν άμεσα με τη FRA10AC1, που συνδέονται μέσω 55 αλληλεπιδράσεων. Οι κόμβοι που περικλείονται με το πράσινο πλαίσιο έχουν ταυτοποιηθεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής. Οι διακεκομμένες γραμμές διαχωρίζουν τις πρωτεΐνες για τις οποίες δεν υπάρχει διαθέσιμη πληροφορία για πυρηνικό εντοπισμό ή δεν εμφανίζουν πυρηνικό εντοπισμό (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018).

Η FRA10AC1 ως συστατικό του σωματίου συναρμογής

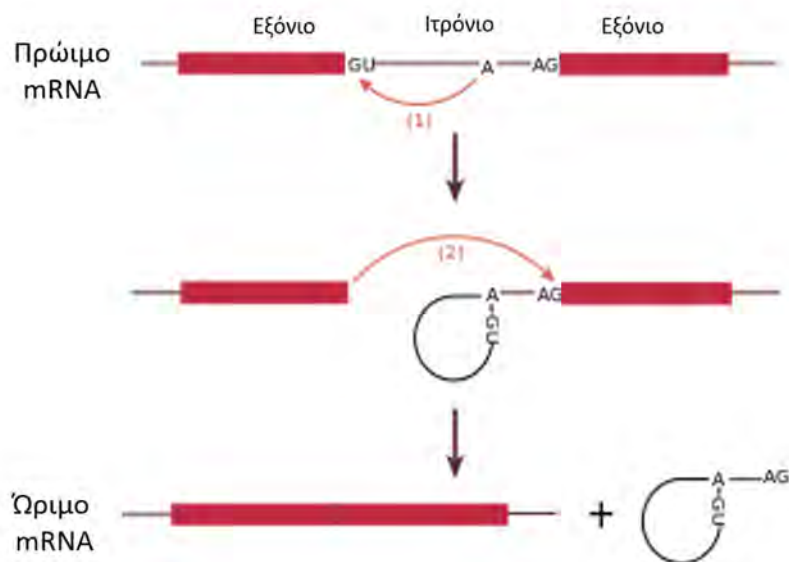
Η διαδικασία της συναρμογής

Τα περισσότερα ευκαρυωτικά γονίδια μεταγράφονται σε πρόδρομα mRNAs (pre-mRNAs) τα οποία μετατρέπονται σε ώριμα mRNAs μέσω της διαδικασίας της συναρμογής. Κατά τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται τα ιντρόνια και τα εξόνια συνδέονται μεταξύ τους, συνήθως κατά τη σειρά που βρίσκονται πάνω στο γονιδίωμα (Nilsen & Graveley 2010). Κατά την εναλλακτική συναρμογή γίνεται παράλειψη ορισμένων εξονίων, οδηγώντας σε διαφορετικές μορφές ώριμων mRNAs, και πιθανώς πρωτεϊνών (Zheng, et al., 2005). Το φαινόμενο της εναλλακτικής συναρμογής αποτελεί χαρακτηριστικό των πιο πολύπλοκων ευκαρυωτικών οργανισμών και ενισχύει την πολυπλοκότητά τους, αυξάνοντας τον αριθμό των διαφορετικών πρωτεϊνών που παράγονται από ένα μόνο γονίδιο (Εικόνα 12) (Nilsen & Graveley 2010).

Τα ιντρόνια απομακρύνονται από πρόδρομα μετάγραφα με διάσπαση σε συντηρημένες αλληλουχίες που ονομάζονται θέσεις συναρμογής και βρίσκονται στα 5' και 3' άκρα των ιντρονίων μέσω δύο αντιδράσεων διεστεροποίησης (Εικόνα 13). Συνήθως η αλληλουχία RNA που απομακρύνεται έχει την αλληλουχία GU στο 5' άκρο και AG στο 3' άκρο. Σπανιότερα, συναντώνται εναλλακτικές αλληλουχίες στη θέση συναρμογής με AU στο 5' άκρο και AC στο 3' άκρο του ιντρονίου. Οι αλληλουχίες αυτές παίζουν καίριο ρόλο, διότι η αλλαγή ενός από τα συντηρημένα νουκλεοτίδια οδηγεί σε αναστολή της συναρμογής. Μια άλλη σημαντική και απαραίτητη αλληλουχία είναι το σημείο διακλάδωσης, που είναι μια αδερίνη που εντοπίζεται 18 έως 40 νουκλεοτίδια ανοδικά του 3' άκρου ενός ιντρονίου. Μία χαρακτηριστική αλληλουχία που συχνά περιβάλλει το σημείο διακλάδωσης είναι η YNYYRAY, όπου το Y υποδεικνύει πυριμιδίνη, το N οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο, το R πουρίνη και το A την αδερίνη του σημείου διακλάδωσης (Clancy, 2008).



Εικόνα 12: Η εναλλακτική συναρμογή. Η παραγωγή εναλλακτικών μεταγράφων που επιτυγχάνεται με την παράλειψη διαφόρων εξονίων οδηγεί στην παραγωγή διαφόρων ισομορφών πρωτεϊνών από ένα μόνο γονίδιο. Πηγή: <https://bitesizebio.com/10148/what-is-alternative-splicing-and-why-is-it-important/>

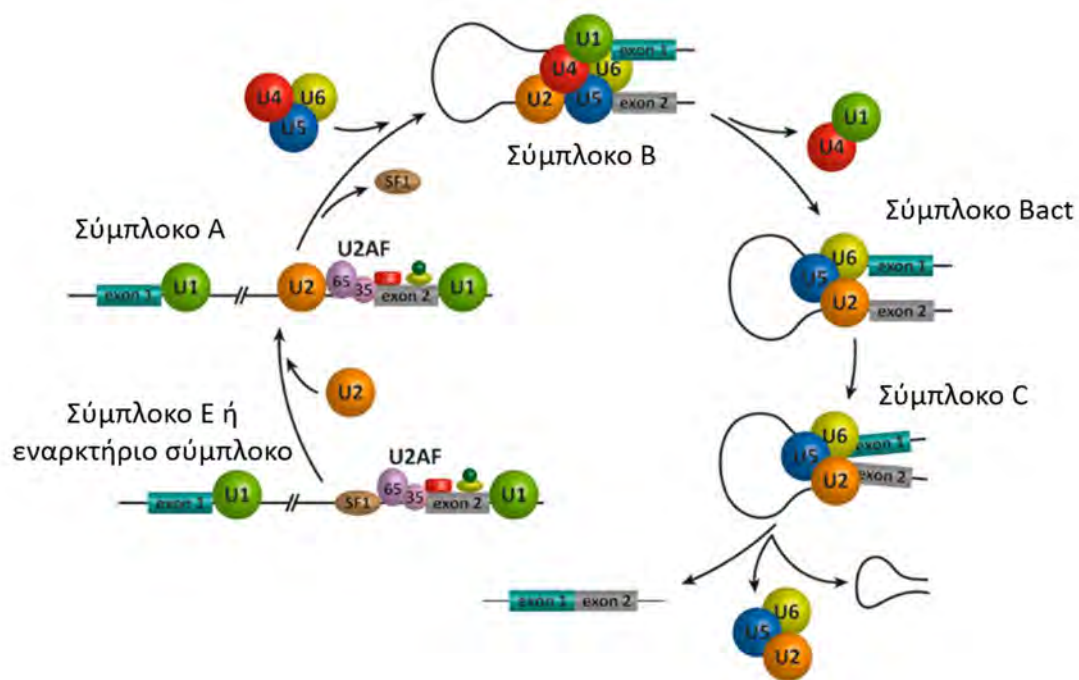


Εικόνα 13: Η διαδικασία της συναρμογής. Η συναρμογή γίνεται μέσω δύο αντιδράσεων διεστεροποίησης (1), (2). Τα ιντρόνια φέρουν τις συντηρημένες αλληλουχίες GU στο 5' και AG στο 3' άκρο, καθώς και μια A 18-40 νουκλεοτίδια ανοδικά του 3' άκρου του ιντρονίου. Πηγή: <https://www.ck12.org/biology/rna-types/lesson/Messenger-RNA-Advanced-BIO-ADV/>

Η συναρμογή του πυρηνικού pre-mRNA καταλύεται από το σύμπλοκο συναρμογής, ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο μεγάλου μοριακού βάρους. Τόσο η διαμόρφωση όσο και η σύνθεση του σωματίου συναρμογής είναι εξαιρετικά δυναμικές, παρέχοντας στο μηχανισμό συναρμογής σημαντική ακρίβεια και ευελιξία (Patel & Steitz, 2003). Το σωματίο συναρμογής, βάσει των ριβονουκλεοπρωτεϊνών που συμμετέχουν σε αυτό και το στάδιο της διεργασίας, διακρίνεται στα εξής σύμπλοκα: το εναρκτήριο σύμπλοκο E, το σύμπλοκο A, το σύμπλοκο B, το ενεργοποιημένο σύμπλοκο B-act, το καταλυτικό σύμπλοκο C και το μετακαταλυτικό σύμπλοκο P (Will & Lührmann, 2011).

Στο εναρκτήριο σύμπλοκο E γίνεται σύνδεση του snRNP U1 με τη συμπληρωματική αλληλουχία του εντός του ιντρονίου κοντά στο 5' άκρο του, προκαλώντας διάσπαση του pre-mRNA στο 5' άκρο. Στη συνέχεια, το U2 snRNP συνδέεται σταθερά στο 3' άκρο του ιντρονίου, σχηματίζοντας το σύμπλοκο A. Το τεμαχισμένο 5' άκρο του ιντρονίου συνδέεται στην αδερίνη που βρίσκεται στο σημείο διακλάδωσης, μέσω ζευγαρώματος της γουανίνης από το 5' άκρο και της αδερίνης του σημείου διακλάδωσης, σχηματίζοντας ένα βρόγχο (σύμπλοκο B). Η σύνδεση των βάσεων γουανίνης και αδερίνης λαμβάνει χώρα μέσω μιας χημικής αντίδρασης διεστεροποίησης, στην οποία μια ομάδα υδροξυλίου (OH) ενός ατόμου άνθρακα της αδερίνης «επιτίθεται» στο δεσμό του νουκλεοτιδίου γουανίνης στη θέση συναρμογής. Η γουανίνη που βρίσκεται στην αρχή του ιντρονίου διασπάται έτσι από το RNA και σχηματίζει ένα νέο δεσμό με την αδερίνη του σημείου διακλάδωσης στο ενεργοποιημένο σύμπλοκο B-act (Εικόνα 14) (Clancy, 2008).

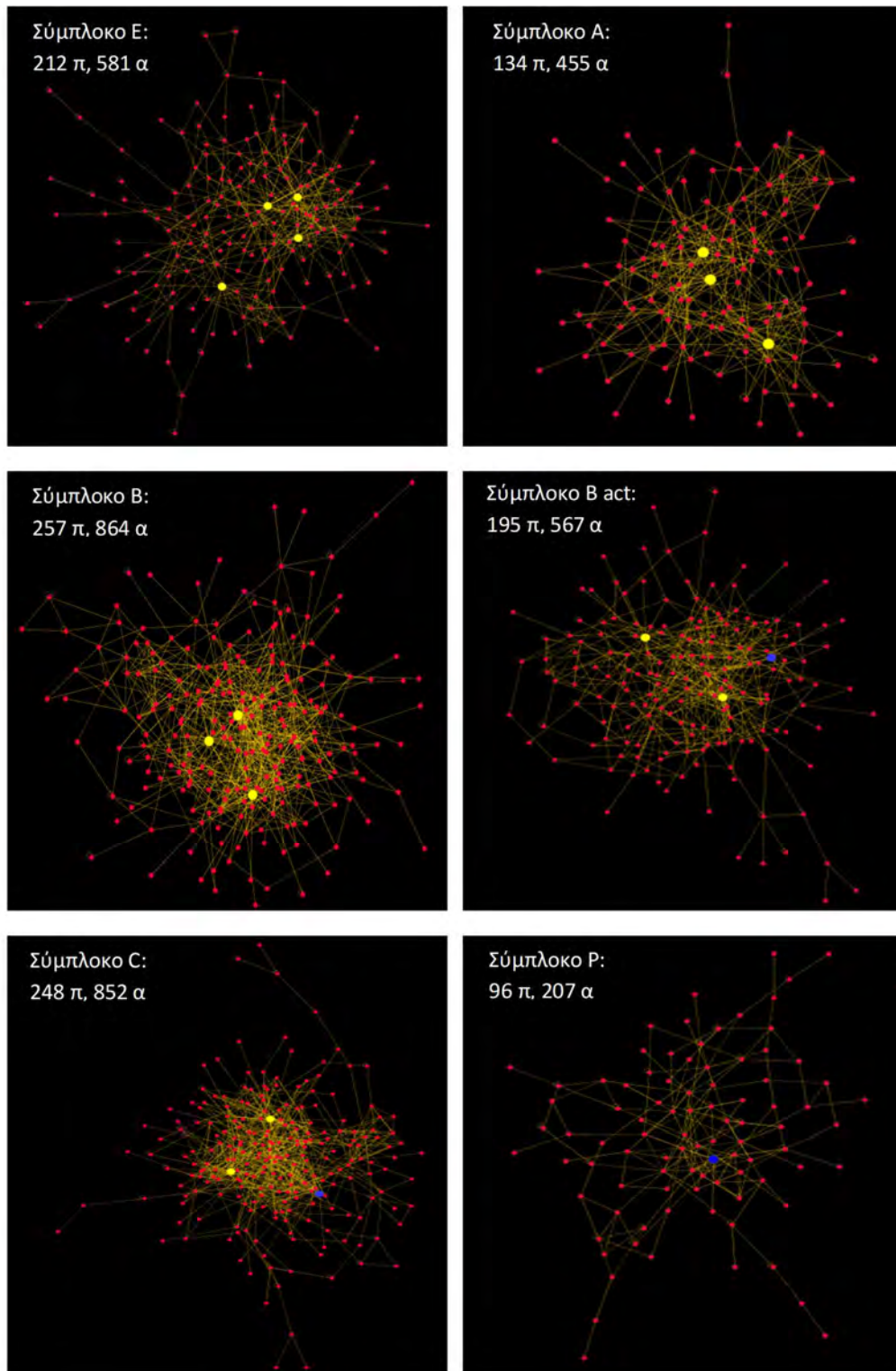
Στο καταλυτικό σύμπλοκο C, τα snRNPs U2 και U4 / U6 συμβάλλουν στην τοποθέτηση του 5' άκρου κοντά στο σημείο διακλάδωσης. Με τη συμμετοχή του U5, το 3' άκρο του ιντρονίου έρχεται σε εγγύτητα, κόβεται και ενώνεται στο 5' άκρο μέσω διεστεροποίησης. Στην αντίδραση αυτή, μια ομάδα OH από το 3' άκρο του εξονίου «επιτίθεται» στο φωσφοδιεστερικό δεσμό που βρίσκεται στην 3' θέση συναρμογής. Στο μετακαταλυτικό σύμπλοκο P τα γειτονικά εξόνια δεσμεύονται ομοιοπολικά και το προκύπτον ώριμο mRNA απελευθερώνεται από τα U2, U5 και U6 που είναι συνδεδεμένα με αυτό (Εικόνα 14) (Clancy, 2008).



Εικόνα 14: Τα στάδια της συναρμογής και τα επιμέρους σύμπλοκα που σχηματίζονται.
 Πηγή: Suñé-Pou, et al., 2017, με τροποποιήσεις

Ο ρόλος της FRA10AC1 στο σωματίο συναρμογής

Οι μελέτες απομόνωσης των συστατικών του σωματίου συναρμογής έχουν απομονώσει τη FRA10AC1 ως συστατικό του ολικού σωματίου, καθώς και επιμέρους συμπλόκων του. Συγκεκριμένα, η FRA10AC1 έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό των συμπλόκων B-act, C και P, επομένως, εισέρχεται στο σωματίο συναρμογής στο ενεργοποιημένο σύμπλοκο B-act και παραμένει ως συστατικό του μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας. Στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της Γαλλιοπούλου (2018) κατασκευάστηκε το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων των επιμέρους συμπλόκων του σωματίου συναρμογής (Εικόνα 15) (Gallioroulou, et al., 2015, Gallioroulou, et al., 2015). Η FRA10AC1 εντοπίζεται σε 3 από τα 6 σύμπλοκα του σωματίου συναρμογής (Hegele, et al., 2012), ωστόσο, ο ακριβής ρόλος της παραμένει ασαφής.



Εικόνα 15: Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων των επιμέρους συμπλόκων του σωματίου συναρμογής (π: πρωτεΐνες, α: ακμές). Με κόμβο κίτρινου χρώματος σημαίνονται οι κεντρικοί κόμβοι των δικτύων και με μπλε κόμβο η FRA10AC1. Όπως παρατηρείται, η FRA10AC1 εισέρχεται στο σωματίο συναρμογής στο σύμπλοκο B-act και παραμένει ως συστατικό του μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018, Galliopoulou, et al., 2015, Galliopoulou, et al., 2015).

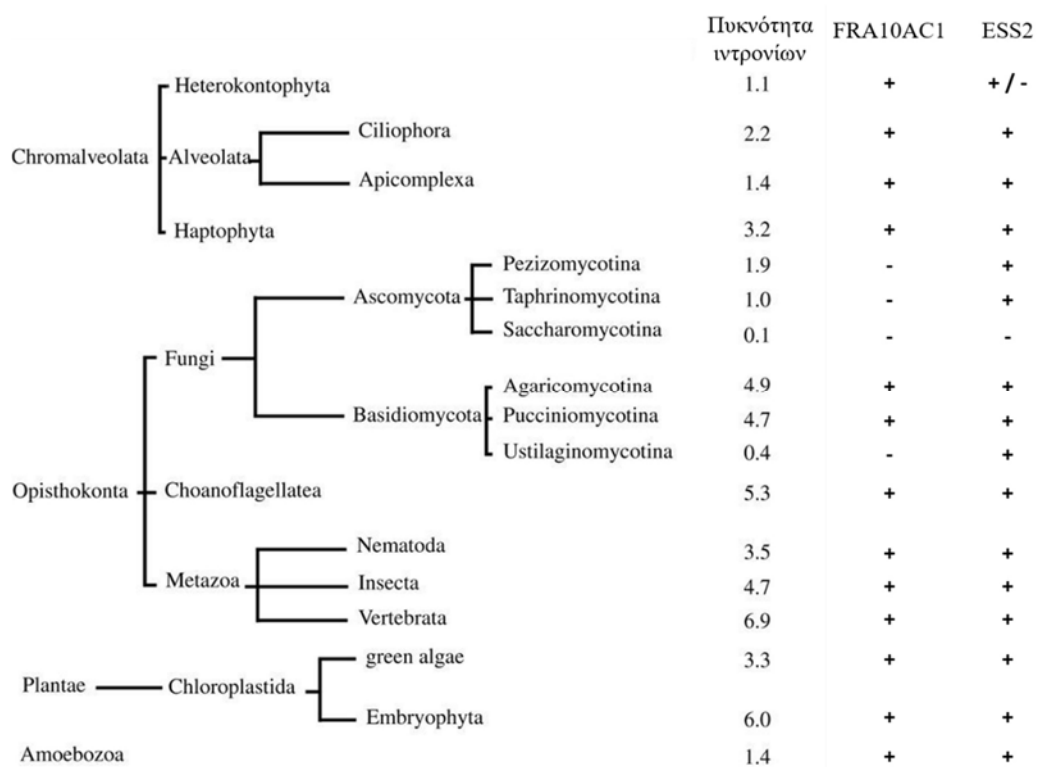
Οι Lin, et al. (2018) δημοσίευσαν μια έρευνα που δείχνει για πρώτη φορά το ρόλο της FRA10AC1 στη διαδικασία της συναρμογής. Στην έρευνά τους μελέτησαν στελέχη του φύκου *Chlamydomonas reinhardtii* που έφεραν δυσλειτουργικά μαστίγια. Κάνοντας αλληλούχηση του γονιδιώματος των φυκών ταυτοποιήθηκαν δύο μεταλλάξεις στα γονίδια *IFT* που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπεύθυνες για την ενδοκυττάρια μεταφορά πρωτεϊνών στα μαστίγια και τις βλεφαρίδες. Οι μεταλλάξεις εντοπίστηκαν σε θέσεις συναρμογής στα γονίδια *IFT81* και *IFT121* στην 3' και 5' θέση συναρμογής αντίστοιχα, οδηγώντας σε λάθος συναρμογή των μεταγράφων, παραγωγή μη φυσιολογικών πρωτεϊνών και εμφάνιση δυσλειτουργικών μαστιγίων (Lin, et al., 2018). Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η παραγωγή μη φυσιολογικών πρωτεϊνών οφειλόταν στη λάθος συναρμογή των μεταγράφων υπέθεσαν ότι η δημιουργία μεταλλάξεων σε πρωτεΐνες του σωματίου συναρμογής μπορεί να οδηγήσει σε παράβλεψη της μετάλλαξης του γονιδίου και την παραγωγή φυσιολογικών μεταγράφων. Παρατήρησαν ότι στα στελέχη που έφεραν ταυτόχρονα μετάλλαξη στις θέσεις συναρμογής των γονιδίων *IFT* και μετάλλαξη αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης στο γονίδιο *fra10* η συναρμογή του *IFT121* γινόταν φυσιολογικά. Επιπλέον, στα στελέχη που έφεραν μετάλλαξη ελλείμματος στο γονίδιο *dgr14-1* γινόταν φυσιολογικά η συναρμογή του γονιδίου *IFT81*. Στη συνέχεια δημιούργησαν στελέχη που έφεραν ταυτόχρονα μεταλλάξεις στα γονίδια *fra10* και *dgr14-1* και παρατήρησαν ότι η συναρμογή των μεταγράφων γινόταν φυσιολογικά, παρά την ύπαρξη μεταλλάξεων στις θέσεις συναρμογής των γονιδίων *IFT*, με αποτέλεσμα τα φύκη να έχουν φυσιολογικό φαινότυπο (Lin, et al., 2018).

Η *fra10* και η *dgr14-1* είναι ορθόλογες πρωτεΐνες των αντίστοιχων FRA10AC1 και ESS2 του ανθρώπου. Έχειδειχθεί ότι η FRA10AC1 αλληλεπιδρά άμεσα με την ESS2 σε διάφορους οργανισμούς (*Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*), υποδεικνύοντας ότι η αλληλεπίδραση είναι εξελικτικά συντηρημένη. Από την παραπάνω μελέτη προκύπτει ότι η FRA10AC1 και η ESS2 έχουν λειτουργικό ρόλο στην αναγνώριση εναλλακτικών θέσεων συναρμογής (Lin, et al., 2018).

Ο λειτουργικός ρόλος της ESS2 στην αναγνώριση θέσεων συναρμογής έχειδειχθεί και πρωτύτερα στη μελέτη των Noma, et al. (2014). Στην έρευνα αυτή μελετήθηκαν στελέχη του είδους *C. elegans*, που έφεραν μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας στο γονίδιο *rpm-1*, η οποία οδηγούσε σε υπερανάπτυξη του νευράξονα και ανώμαλη προσυναπτική μορφολογία. Σε προηγούμενες μελέτες έχειδειχθεί ότι η RPM-1 ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι σηματοδότησης της κινάσης DLP-1 MAP.

Παρατηρήθηκε ότι μεταλλάξεις απώλειας της λειτουργίας στο *ess-2* (ορθόλογο του *ESS2* του ανθρώπου) καταστέλλουν το *rpm-1* όταν υπάρχει μετάλλαξη στην 3' θέση συναρμογής του *dlk-1*. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει ότι η *ESS2* έχει λειτουργικό ρόλο ως συστατικό του σωματίου συναρμογής στην αναγνώριση εναλλακτικών θέσεων συναρμογής (Noma, et al., 2014).

Κάνοντας φυλογενετική ανάλυση των πρωτεϊνών *FRA10AC1* και *ESS2*, οι Lin, et al. (2018) παρατήρησαν ότι οι δύο πρωτεΐνες ανιχνεύονται σε μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς με αυξημένη πολυπλοκότητα, πιθανότατα συμβάλλοντας στη δυνατότητα αναγνώρισης εναλλακτικών θέσεων συναρμογής, δίνοντας τη δυνατότητα παραγωγής πρωτεϊνών με διαφορετικές λειτουργίες από ένα μόνο γονίδιο. Η ύπαρξη των γονιδίων αυτών συσχετίστηκε, μάλιστα, με την πυκνότητα των ιντρονίων στο γονιδίωμα των ειδών, επομένως τη δυναμικότητα παραγωγής εναλλακτικών μεταγράφων (Εικόνα 16) (Lin, et al., 2018).



Εικόνα 16: Κατανομή των ορθόλογων πρωτεϊνών των *FRA10AC1* και *ESS2* σε διάφορους ευκαρυωτικούς μονοκύτταρους οργανισμούς και η συσχέτισή τους με τη μέση πυκνότητα ιντρονίων ανά κωδικοποιητική περιοχή 1 kb. Πηγή: Lin, et al., 2018, με τροποποιήσεις

Συσχέτιση του *FRA10AC1* με νοσήματα βάσει Γενετικής Ανάλυσης Γονιδιωματικής Κλίμακας (GWAS)

Οι Μελέτες Γενετικής Ανάλυσης Γονιδιωματικής Κλίμακας (Genome Wide Association Studies-GWAS) είναι μια προσέγγιση που χρησιμοποιείται στην έρευνα στον τομέα της Γενετικής για τη συσχέτιση συγκεκριμένων γενετικών πολυμορφισμών με συγκεκριμένες ασθένειες. Η μέθοδος περιλαμβάνει τη σάρωση του γονιδιώματος από πολλούς διαφορετικούς ανθρώπους και την αναζήτηση γενετικών δεικτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της εμφάνισης μιας ασθένειας. Μόλις ταυτοποιηθούν οι γενετικοί αυτοί δείκτες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να κατανοηθεί πώς τα γονίδια συμβάλλουν στη νόσο και να αναπτυχθούν καλύτερες στρατηγικές πρόληψης και θεραπείας (National Human Genome Research Institute).

Για την εύρεση των δεικτών γίνεται ανάλυση του γονιδιώματος πολλών ανθρώπων και καταγράφονται οι πολυμορφισμοί που ανιχνεύονται. Το γονιδίωμα δύο τυχαίων ατόμων διαφέρει περίπου κατά είκοσι εκατομμύρια βάσεις. Για να βρεθεί ποιοι από αυτούς τους πολυμορφισμούς συσχετίζονται με ένα χαρακτηριστικό ή μια ασθένεια ακολουθούνται δύο ξεχωριστές προσεγγίσεις. Στην πρώτη μέθοδο γίνεται έλεγχος του γονιδιώματος ενός ατόμου που είναι γνωστό ότι πάσχει από μία ασθένεια και συγκρίνεται με υγιή άτομα. Οι πολυμορφισμοί που ανιχνεύονται μόνο στον ασθενή θεωρείται ότι συσχετίζονται με την εμφάνιση της ασθένειας. Στη δεύτερη προσέγγιση γίνεται ανάλυση του γονιδιώματος πολλών ατόμων και παρατηρείται αν ένας συγκεκριμένος πολυμορφισμός ανιχνεύεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε μια ομάδα ατόμων. Έπειτα, παρατηρείται σε τι διαφέρει φαινοτυπικά η ομάδα αυτή που φέρει τον πολυμορφισμό (πχ. υψηλότερη πίεση) και έτσι ο πολυμορφισμός συσχετίζεται με την αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης του χαρακτηριστικού αυτού (Manolio, 2010).

Το GWAS catalog (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) είναι μια διαδικτυακή βάση δεδομένων υπό την αιγίδα του National Human Genome Research Institute, στην οποία δημοσιεύονται συνδέσεις που έχουν βρεθεί ανάμεσα σε μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs) και διάφορα χαρακτηριστικά ή ασθένειες, με τιμή σημαντικότητας ($p\text{-value}$) $< 10^{-5}$ (Buniello, et al., 2019). Κάνοντας αναζήτηση στην GWAS catalog για πολυμορφισμούς που βρίσκονται στο γονίδιο *FRA10AC1* και σχετίζονται με ασθένειες, βρέθηκαν πέντε πολυμορφισμοί που σχετίζονται με αλλαγή φαινοτύπου με τιμή σημαντικότητας $< 10^{-5}$ (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Τα αποτελέσματα της αναζήτησης στην GWAS catalog χρησιμοποιώντας τον όρο “FRA10AC1” (NHGRI-EBI GWAS Catalog).

SNPS	MAPPED_GENE	CONTEXT	DISEASE/TRAIT	P-VALUE
rs140546855	<i>FRA10AC1</i>	intron_variant	DNA methylation variation (age effect)	7×10^{-9}
rs116953792	<i>FRA10AC1 - LGII</i>	regulatory_region_variant	Cerebrospinal fluid AB1-42 levels	8×10^{-11}
rs75953396	<i>FRA10AC1 - LGII</i>	intergenic_variant	Response to perphenazine in schizophrenia	5×10^{-6}
rs79105493	<i>FRA10AC1 - LGII</i>	intergenic_variant	Post bronchodilator FEV1/FVC ratio	3×10^{-6}
rs59824868	<i>FRA10AC1 - LGII</i>	intergenic_variant	Response to efavirenz-containing treatment in HIV 1 infection (virologic failure)	5×10^{-6}

Μεθυλίωση του DNA – rs140546855

Η μεθυλίωση του DNA είναι μια ευρέως μελετημένη επιγενετική τροποποίηση που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA διαφέρουν από περιοχή σε περιοχή στο γονιδίωμα, αλλά και μεταξύ των ατόμων. Οι διαφορές που παρατηρούνται στη μεθυλίωση σχετίζονται τόσο με γενετικούς όσο και με περιβαλλοντικούς παράγοντες (Zhang, et al., 2018). Έχει παρατηρηθεί ότι ο βαθμός μεθυλίωσης σε νησίδες CpG, όπως είναι η περιοχή των επαναλήψεων της τρινουκλεοδικής αλληλουχίας CGG στην 5' αμετάφραστη περιοχή του *FRA10AC1*, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ηλικία του ατόμου (Florath, et al., 2013). Ωστόσο, ο βαθμός μεθυλίωσης δεν είναι απολύτως ανάλογος της ηλικίας και διαφέρει ανάμεσα σε άτομα της ίδιας ηλικίας, υποδεικνύοντας ότι παίζουν ρόλο και άλλοι παράγοντες. Στην έρευνα των Zhang, et al. (2018) μελετήθηκε η μεθυλίωση σε 344000 σημεία του γονιδιώματος σε ηλικιωμένα άτομα δύο κοορτών, με διαφορά ηλικίας δεκαπέντε χρόνων (άτομα γεννημένα το 1921 και το 1936 αντίστοιχα) και στη συνέχεια αναζητήθηκαν πολυμορφισμοί που σχετίζονται με το βαθμό μεθυλίωσης που

παρατηρήθηκε. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 436 μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί με τιμή σημαντικότητας $< 5 \times 10^{-8}$.

Ένας από τους στατιστικά σημαντικούς πολυμορφισμούς που παρατηρήθηκε, με τιμή σημαντικότητας 7×10^{-9} είναι το rs140546855 (NHGRI-EBI GWAS Catalog, Zhang, et al., 2018), το οποίο βρίσκεται στο ιντρόνιο 12 του *FRA10AC1* και είναι αλλαγή μιας C από G. Ο πολυμορφισμός αυτός ανιχνεύεται σε συχνότητα περίπου 1 στα 100 αλληλόμορφα (Database of Single Nucleotide Polymorphisms, dbSNP) και συσχετίστηκε με διαφοροποίηση του βαθμού μεθυλίωσης του DNA σε ηλικιωμένα άτομα (NHGRI-EBI GWAS Catalog, Zhang, et al., 2018).

Νόσος του Alzheimer – rs116953792

Η νόσος του Alzheimer είναι η πιο συχνή μορφή άνοιας, εκπροσωπώντας τουλάχιστον τα δύο τρίτα των περιπτώσεων άνοιας σε άτομα ηλικίας 65 ετών και άνω. Η νόσος του Alzheimer είναι μια νευροεκφυλιστική ασθένεια που προκαλεί προοδευτική βλάβη των γνωστικών και λειτουργικών ικανοτήτων, συμπεριλαμβανομένης της μνήμης, της κατανόησης, της ομιλίας, της προσοχής, της σκέψης και της κρίσης. Το 2018 περίπου 24 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως έπασχαν από άνοια, με το Alzheimer να αποτελεί την έκτη κατά σειρά αιτία θανάτου στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής. Η νόσος του Alzheimer χαρακτηρίζεται και ως ασθένεια του γήρατος, αφού ο κίνδυνος εμφάνισης αυξάνεται σημαντικά μετά τα 65 έτη και όσο μεγαλώνει η ηλικία. Η εμφάνιση της νόσου πριν από την ηλικία των 65 ετών (πρώιμη έναρξη) είναι ασυνήθιστη και παρατηρείται σε λιγότερο από το 10% των ασθενών (Tang, et al., 2019).

Η νόσος ταξινομείται σε προκλινικό, ήπιο, μέτριο και προχωρημένο στάδιο, ανάλογα με το βαθμό της γνωστικής εξασθένησης, ως αποτέλεσμα της εγκεφαλικής ατροφίας. Το σύμπτωμα που παρουσιάζεται πρώτο είναι συνήθως η απώλεια της βραχυπρόθεσμης μνήμης, με σχετική απώλεια και της μακροπρόθεσμης. Η διαταραχή της βραχυπρόθεσμης μνήμης ακολουθείται από την εξασθένηση της ικανότητας επίλυσης προβλημάτων, κρίσης και λειτουργικότητας. Στη συνέχεια, εμφανίζονται σταδιακά γλωσσικές διαταραχές και εξασθένηση των οπτικοακουστικών δεξιοτήτων. Νευροψυχιατρικά συμπτώματα, όπως η απάθεια, η κοινωνική απόσυρση, η αποθάρρυνση και η ψύχωση, εμφανίζονται επίσης συχνά στα ενδιάμεσα και προχωρημένα στάδια της νόσου. Στα τελευταία στάδια της ασθένειας εμφανίζονται

δυσκολίες στην εκμάθηση εξειδικευμένων κινητικών λειτουργιών (δυσπραξία), οσφρητική δυσλειτουργία, διαταραχές του ύπνου και παρκινσονικά συμπτώματα (Tang, et al., 2019).

Ο μηχανισμός εμφάνισης της ασθένειας βασίζεται στη συσσώρευση μη φυσιολογικών νευριτικών πλακών και νευροϊνιδιακών δικτύων, οδηγώντας σε σταδιακή ατροφία του εγκεφάλου. Οι νευριτικές πλάκες δημιουργούνται από τη συσσώρευση β-αμυλοειδών πεπτιδίων στον εγκέφαλο, οδηγώντας σε βλάβες των νευρώνων που βρίσκονται εκεί. Το β-αμυλοειδές πεπτίδιο προέρχεται από μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη γνωστή ως πρόδρομη πρωτεΐνη αμυλοειδούς (APP). Το β-αμυλοειδές πεπτίδιο διασπάται από την APP με τη δράση των πρωτεασών άλφα, βήτα και γάμα-σεκρετάση. Συνήθως, το APP διασπάται είτε με άλφα είτε με βήτα-σεκρετάση και τα μικροσκοπικά θραύσματα που σχηματίζονται από αυτά δεν είναι τοξικά για τους νευρώνες. Εν τούτοις, η διαδοχική διάσπαση με βήτα και μετά γάμμα-σεκρετάση οδηγεί στη δημιουργία πεπτιδίων 40 και 42 αμινοξέων (βήτα-αμυλοειδές 40 και β-αμυλοειδές 42). Η αύξηση της συγκέντρωσης βήτα-αμυλοειδούς 42 οδηγεί σε συσσωμάτωση αμυλοειδούς που προκαλεί νευρωνική τοξικότητα. Το βήτα-αμυλοειδές 42 ευνοεί τη συσσωμάτωση ινωδοειδούς αμυλοειδούς πρωτεΐνης έναντι της κανονικής αποικοδόμησης της APP. Η εναπόθεση αμυλοειδούς συμβαίνει γύρω από μηνιγγικά και εγκεφαλικά αγγεία και στη φαιά ουσία του εγκεφάλου. Οι αποθέσεις στη φαιά ουσία είναι πολυεστιακές και συνενώνονται σχηματίζοντας μεγαλύτερες δομές που ονομάζονται πλάκες (Wallace, et al., 2018).

Τα νευροϊνιδιακά δίκτυα είναι ινιδιακές δομές που δημιουργούνται από την πρωτεΐνη tau στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων. Η πρωταρχική λειτουργία της πρωτεΐνης tau είναι η σταθεροποίηση των αξονικών μικροσωληνίσκων. Οι μικροσωληνίσκοι διατρέχουν κατά μήκος του νευρικού άξονα και είναι απαραίτητοι για την ενδοκυττάρια μεταφορά. Στη νόσο του Alzheimer, λόγω της συσσωμάτωσης του εξωκυττάριου βήτα-αμυλοειδούς, γίνεται υπερ-φωσφορυλίωση της tau, η οποία προκαλεί τη συσσωμάτωσή της. Τα αδρανή tau σχηματίζουν ελικοειδή νημάτια, γνωστά ως νευροϊνιδιακά δίκτυα που εμφανίζονται αρχικά στον ιππόκαμπο και στη συνέχεια μπορεί να παρατηρηθούν σε ολόκληρο τον εγκεφαλικό φλοιό (Wallace, et al., 2018).

Η νόσος του Alzheimer μπορεί να κληρονομηθεί με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονόμησης με σχεδόν πλήρη διείσδυση, όταν η ασθένεια οφείλεται σε μεταλλάξεις στα εξής γονίδια: το γονίδιο *AAP* που εδράζεται στο χρωμόσωμα 21, το *Presenilin1* (*PSEN1*) που εδράζεται στο χρωμόσωμα 14 και το *Presenilin2* (*PSEN2*) που εδράζεται

στο χρωμόσωμα 1. Οι μεταλλάξεις στο *APP* μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένη παραγωγή και συσσώρευση β-αμυλοειδούς πεπτιδίου. Οι μεταλλάξεις στο *PSEN1* και *PSEN2* οδηγούν σε συσσώρευση του β-αμυλοειδούς, επηρεάζοντας τη λειτουργία της γάμα-σεκρετάσης (Nicolas, et al., 2018).

Η απολιποπρωτεΐνη E συμμετέχει ρυθμιστικά στο λιπιδικό μεταβολισμό, λειτουργία που σχετίζεται με την πρωτεΐνη β-αμυλοειδούς και αποτελεί ένα γενετικό δείκτη που αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου του Alzheimer. Επίσης, σε κάποια περιστατικά με νόσο του Alzheimer έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα σορτιλίνης *SORT1*, το οποίο εκφράζει μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στη μεταφορά της APP από την κυτταρική επιφάνεια στο σύμπλεγμα Golgi και το ενδοπλασματικό δίκτυο (Nicolas, et al., 2018).

Σήμερα, στην GWAS catalog είναι διαθέσιμες 1366 συσχετίσεις πολυμορφισμών με τη νόσο του Alzheimer (NHGRI-EBI GWAS Catalog). Ο πολυμορφισμός rs116953792 βρίσκεται 2 kb ανοδικά του *FRA10AC1*, στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου και είναι αντικατάσταση μιας G από T. Η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού στον πληθυσμό είναι περίπου 2 στα 100 αλληλόμορφα (Database of Single Nucleotide Polymorphisms, dbSNP) και δύο ξεχωριστές έρευνες το έχουν συσχετίσει με αυξημένη συγκέντρωση β-αμυλοειδούς στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών που έπασχαν από Alzheimer (NHGRI-EBI GWAS Catalog, Chung, et al., 2018, Li, et al., 2015).

Μείωση πνευμονικής λειτουργίας – rs79105493

Η μείωση της πνευμονικής λειτουργίας αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες για τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα των καπνιστών (Lutz, et al., 2015). Η εκτίμηση της απόφραξης της ροής του αέρα γίνεται αξιολογώντας τη βρογχοδιασταλή μέσω των FEV1 και FEV1 / FVC, όπου το FEV1 είναι ο όγκος του βεβιασμένα εκπνεόμενου αέρα (σε λίτρα) σε ένα δευτερόλεπτο και το FVC είναι η ζωτική χωρητικότητα των πνευμόνων, η οποία υπολογίζεται από τον όγκο του αέρα που εκπνέεται συνολικά μετά από μια πλήρη εισπνοή (Paine, et al., 2019). Οι Lutz, et al. (2015) πραγματοποίησαν μια Μελέτη Γενετικής Ανάλυσης Γονιδιωματικής Κλίμακας, προκειμένου να ταυτοποιήσουν γενετικούς τόπους που συσχετίζονται με μειωμένη πνευμονική λειτουργία σε καπνιστές. Ανάμεσα στους πολυμορφισμούς που βρέθηκαν, το rs79105493, που βρίσκεται ανάμεσα στα γονίδια *FRA10AC1* και *LGII*,

συσχετίστηκε με μείωση του λόγου FEV1 / FVC, υποδεικνύοντας μειωμένη πνευμονική λειτουργία στους φορείς του πολυμορφισμού, με τιμή σημαντικότητας 3×10^{-6} (NHGRI-EBI GWAS Catalog, Lutz, et al., 2015). Συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός βρίσκεται περίπου 12 kb καθοδικά του *FRA10AC1* και είναι αντικατάσταση μιας Α από C. Ο πολυμορφισμός εντοπίζεται σε συχνότητα περίπου 3 στα 100.000 αλληλόμορφα (Database of Single Nucleotide Polymorphisms, dbSNP).

Απόκριση σε φάρμακα για τη σχιζοφρένεια – rs75953396

Η σχιζοφρένεια είναι μια λειτουργική ψυχωτική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ψευδαισθήσεων και διαταραχών στη σκέψη, την αντίληψη και τη συμπεριφορά. Τα συμπτώματα διαχωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: θετικά συμπτώματα, που περιλαμβάνουν ψευδαισθήσεις, παραληρητικές ιδέες και διαταραχές σκέψης και αρνητικά συμπτώματα, όπως ανενδονία, φτώχεια λόγου και έλλειψη κινήτρων. Η διάγνωση της σχιζοφρένειας γίνεται κλινικά μετά τη λήψη ενός πλήρους ψυχιατρικού ιστορικού και εξαιρώντας άλλες οργανικές αιτίες της ψύχωσης. Στους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της ασθένειας περιλαμβάνονται επιπλοκές στη γέννα, σοβαρός υποσιτισμός της μητέρας, η λοίμωξη από γρίπη κατά την εγκυμοσύνη, η ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού, ένα τραύμα κατά την παιδική ηλικία, η κοινωνική απομόνωση και η χρήση κάνναβης (Messias, et al., 2007). Λόγω της σχετικής πολυπλοκότητας και ετερογένειας, οι αιτιολογίες και οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Παρά τη χαμηλή επικράτηση, το παγκόσμιο βάρος της νόσου της σχιζοφρένειας είναι τεράστιο. Περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς έχουν σημαντικές συννοσηρότητες, ψυχιατρικές και γενικές ιατρικές, καθιστώντας τη μία από τις κύριες αιτίες αναπηρίας παγκοσμίως (Chong, et al., 2016). Η διάγνωση συσχετίζεται με μείωση κατά 20% του προσδόκιμου ζωής, με έως 40% των θανάτων να αποδίδονται στην αυτοκτονία (De Luca, et al., 2006). Η σχιζοφρένεια επηρεάζει περίπου το 1% των ενηλίκων (Patel, et al., 2014) και εμφανίζεται συχνότερα και σε πιο πρόωμη ηλικία σε γυναίκες και σε άτομα με Αφρικανική και Καραϊβική καταγωγή (Kirkbride, et al., 2012).

Η περφαιναζίνη (perphenazine) είναι ένα παλιό αντιψυχωτικό φάρμακο (πρώτης γενιάς) που δημιουργήθηκε τη δεκαετία του 1950 και είναι ιδιαίτερα δημοφιλές στις χώρες της Βόρειας Ευρώπης και την Ιαπωνία (Hartung, et al., 2015). Η ουσία

δεσμεύεται στους υποδοχείς ντοπαμίνης D1 και D2 και στον άλφα αδρενεργικό υποδοχέα, αναστέλλοντας τη δράση τους (DrugBank 5.0, 2017). Στην έρευνα των Yu, et al. (2018) το rs75953396 συσχετίστηκε με την απόκριση ασθενών που πάσχουν από σχιζοφρένεια στην περφαιναζίνη, με τιμή σημαντικότητας 5×10^{-6} (NHGRI-EBI GWAS Catalog, Yu, et al., 2018). Το rs75953396 αναφέρεται σε αντικατάσταση μιας A από G στην περιοχή ανάμεσα στα γονίδια *FRA10AC1* και *LGII*, περίπου 46 kb καθοδικά του *FRA10AC1* και ανιχνεύεται σε συχνότητα περίπου 1 στα 100 αλληλόμορφα (Database of Single Nucleotide Polymorphisms, dbSNP).

Απόκριση σε φάρμακα για το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (HIV/AIDS) – rs59824868

Ο ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) είναι ένας ελντροφόρος ρετροϊός, του οποίου το γονιδίωμα αποτελείται από δύο αντίγραφα ενός μονόκλωνου RNA μορίου. Η λοίμωξη από τον ιό προκαλεί το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS) που είναι το τελευταίο στάδιο της νόσου HIV. Τέσσερις έως 10 εβδομάδες μετά την είσοδο του HIV στον οργανισμό ο ασθενής εμφανίζει συμπτώματα πρωτοπαθούς λοίμωξης, η οποία εξελίσσεται σε μακροχρόνια λοίμωξη HIV και μπορεί να διαρκέσει ακόμη και δεκαετίες (Capriotti, 2018). Το AIDS χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση ευκαιριακών λοιμώξεων και όγκων, οι οποίοι είναι συνήθως θανατηφόροι αν δε δοθεί κατάλληλη θεραπευτική αγωγή. Το 2016 ο εκτιμώμενος αριθμός ατόμων που έπασχαν από AIDS παγκοσμίως ήταν 36,7 εκατομμύρια (Javadi, et al., 2018).

Οι συνιστώμενες θεραπευτικές αγωγές πρώτης γραμμής για τη μόλυνση από HIV είναι ο αναστολέας της μη-νουκλεοσιδικής αντίστροφης μεταγραφάσης (NNRTI) εφαβιρένζη (efavirenz) και ο αναστολέας της νουκλεοσιδικής αντίστροφης μεταγραφάσης (NRTI) αβακαβίρη (abacavir). Ωστόσο, τα δεδομένα δείχνουν ότι γενετικοί πολυμορφισμοί επηρεάζουν την απόκριση των ασθενών στα φάρμακα αυτά (Lehmann, et al., 2015). Στη μελέτη των Lehmann, et al. (2015) ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs59824868, ο οποίος εντοπίζεται ανάμεσα στα γονίδια *FRA10AC1* και *LGII*, συσχετίστηκε με μείωση της απόκρισης του ασθενή στη θεραπευτική αγωγή με εφαβιρένζη, με τιμή σημαντικότητας 5×10^{-6} (NHGRI-EBI GWAS Catalog, Lehmann, et al., 2015). Το rs59824868 είναι αντικατάσταση μιας C από A περίπου 15 kb

καθοδικά του *FRA10C1* και εντοπίζεται με συχνότητα περίπου 1 στα 10 αλληλόμορφα (Database of Single Nucleotide Polymorphisms, dbSNP).

Αποτελέσματα από την ομική ανάλυση κλώνων κυττάρων *HeLa* που υποεκφράζουν το *FRA10AC1*

Στόχος του προγράμματος FRA-SYS («Συνδυαστικές ομικές αναλύσεις σε ανθρώπινο κυτταρικό μοντέλο μετά από τροποποίηση της έκφρασης του *FRA10AC1*») ήταν η ταυτοποίηση των μοριακών λειτουργιών στις οποίες ενέχεται η *FRA10AC1* με συνδυαστική ομική ανάλυση σε μεταβολομικό, πρωτεομικό και μεταγραφομικό επίπεδο. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν κλώνοι κυττάρων *HeLa* στους οποίους έγινε μόνιμη καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1*. Για την επίτευξη της καταστολής έγινε διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων *HeLa* με πλασμιδιακό φορέα που φέρει γονίδιο έκφρασης μικρού μήκους τμημάτων RNA που είναι συμπληρωματικά του mRNA που παράγεται από τη μεταγραφή του γονιδίου-στόχου (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Λόγω συμπληρωματικότητας, τα δύο μόρια RNA υβριδοποιούνται, παρεμποδίζοντας τη μετάφραση του mRNA του γονιδίου. Το δίκλωνο RNA αναγνωρίζεται από τους μηχανισμούς άμυνας του κυττάρου και καταστρέφεται (Han, 2018).

Η συνδυαστική ομική ανάλυση έδειξε ότι η καταστολή της έκφρασης του *FRA10AC1* οδήγησε σε διατάραξη της διαδικασίας συναρμογής των pre-mRNAs και των μονοπατιών που σχετίζονται με την επεξεργασία των mRNAs. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι επηρεάζονται μονοπάτια που ρυθμίζουν τη δομή και την οργάνωση του κυτταροσκελετού και διαταράσσεται η λειτουργία και η δομή του ενδοπλασματικού δικτύου και του συμπλέγματος Golgi. Όσον αφορά το μεταβολισμό των κυττάρων, παρατηρήθηκε απορρύθμιση της ομοιόστασης της γλυκόζης και της χοληστερόλης (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018, Papadimitropoulos et al., 2019).

ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΣΤΟΧΟΙ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η συμβολή στη λειτουργική διερεύνηση του βιοχημικού λειτουργικού ρόλου της FRA10AC1 με την εφαρμογή μοριακών τεχνικών και την αξιοποίηση βιοϋπολογιστικών εργαλείων. Σε προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες είχαν αναπτυχθεί και μελετηθεί με συνδυαστική ομική ανάλυση κλώνοι κυττάρων *HeLa* με καταστολή της έκφρασης του *FRA10AC1*. Επιπλέον, σε προκαταρκτικά πειράματα είχαμε αναπτύξει κλώνους κυττάρων *HeLa* που είχαν υποστεί διαμόλυνση με πλήρους μήκους διαγονίδιο *FRA10AC1* ενσωματωμένο στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1/His C. Οι κλώνοι αυτοί αναπτύχθηκαν με στόχο την υπερέκφραση του FRA10AC1 και τη μελέτη της επίδρασής της στη φυσιολογία του κυττάρου. Ο πρώτος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση των κλώνων αυτών σχετικά με την ακεραιότητα του διαγονιδίου που έχει ενσωματωθεί στο γενετικό τους υλικό.

Οι κλώνοι κυττάρων που είχαν αναπτυχθεί ελέγχθηκαν και παρατηρήθηκε ότι έφεραν έλλειμμα στο 5' άκρο του διαγονιδίου *FRA10AC1*. Ως δεύτερος στόχος τέθηκε η ανάπτυξη και πιστοποίηση νέων κλώνων κυττάρων υπερέκφρασης του *FRA10AC1* και η μοριακή φαινοτύπησή τους σε επίπεδο μεταγράφου και πρωτεΐνης.

Στα πλαίσια της βιοπληροφορικής ανάλυσης θελήσαμε να αξιοποιήσουμε βιοϋπολογιστικά εργαλεία, ώστε να δημιουργηθούν οι πιο αξιόπιστες υποθέσεις εργασίας για περαιτέρω αξιοποίηση των κλώνων που αναπτύχθηκαν. Στόχος της βιοπληροφορικής ανάλυσης ήταν η επικαιροποίηση του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των μελών με βάση τα πιο πρόσφατα δεδομένα, ο εμπλουτισμός του δικτύου με δεδομένα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων από άλλους οργανισμούς και η διερεύνηση της τοπολογίας του πρωτεϊνικού δικτύου της FRA10AC1 μέσω ανάλυσης των προτύπων γονιδιακής έκφρασης σε διάφορους ιστούς.

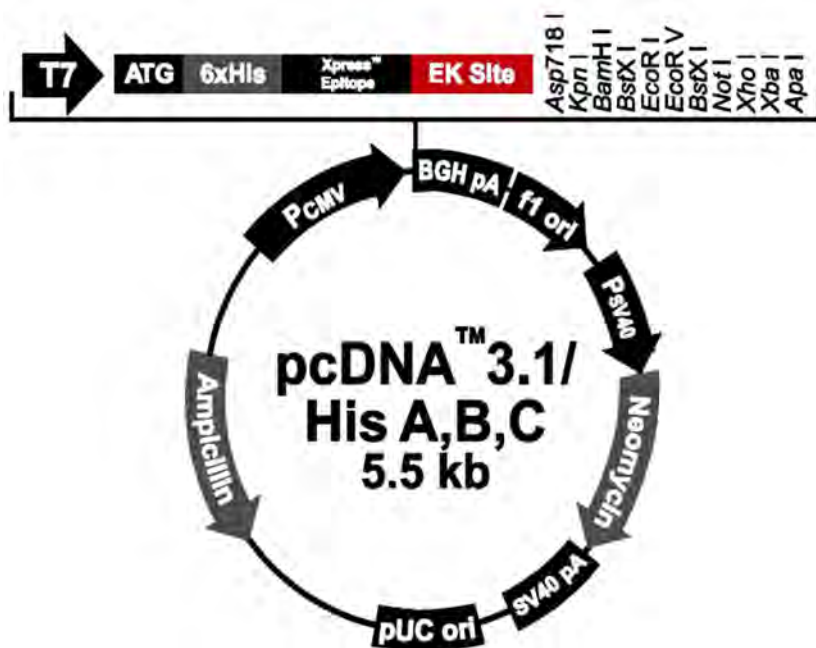
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Μοριακές τεχνικές

Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1/His A, B, και C

Για την παρασκευή κλώνων κυττάρων *HeLa* που υπερεκφράζουν το γονίδιο *FRA10AC1* χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pcDNATM3.1/His A, B, & C (Εικόνα 17). Οι pcDNA3.1/His A, B και C είναι πλασμιδιακοί φορείς μήκους 5,5 kb που προέρχονται από μετατροπή φορέα pcDNA3.1 και έχουν σχεδιαστεί για υψηλού επιπέδου έκφραση και καθαρισμό ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα θηλαστικών. Οι φορείς παρέχονται σε τρία πλαίσια ανάγνωσης (A, B, C) για να διευκολυνθεί η ένθεση του διαγονιδίου σε κατάλληλο πλαίσιο ανάγνωσης με τους επιτόπους ελέγχου της έκφρασης που υπάρχουν στο φορέα (<http://www.biofeng.com/zaiti/buru/pcDNA3.1-HisC.html>).

Ο pcDNA3.1/His A, B και C φέρει μια περιοχή πολυσυνδέτη (περιοχή βάσεων 1000-1109), όπου υπάρχουν μοναδικές θέσεις αναγνώρισης από διάφορα ένζυμα περιορισμού και γίνεται η ένθεση του διαγονιδίου. Στην περιοχή των βάσεων 235-614 βρίσκεται ο εκκινητής (CMV enhancer) και στην περιοχή 615-818 ο υποκινητής έκφρασης του κυτταρομεγαλοϊού (CMV promoter). Ο κυτταρομεγαλοϊός είναι ένας κοινός ιός που ανήκει στην οικογένεια των ερπητοϊών και προσβάλλει τον άνθρωπο. Ο υποκινητής CMV επιτρέπει υψηλή έκφραση του διαγονιδίου που ενθέτεται στο φορέα στην περιοχή του πολυσυνδέτη σε κύτταρα θηλαστικών (Εικόνα 17) (Barrow, et al., 2006). Επιπλέον, στην περιοχή 863-881 βρίσκεται ο υποκινητής T7, που προέρχεται από το βακτηριοφάγο T7 και μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης για την επίτευξη υψηλής έκφρασης του διαγονιδίου, χρησιμοποιώντας T7 RNA πολυμεράση. Ο υποκινητής αυτός χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις που η υπερέκφραση μέσω του υποκινητή CMV παρεμποδίζεται από τους μηχανισμούς μεθυλίωσης των ευκαρυωτικών κυττάρων (Ghaderi, et al., 2014). Μετά την περιοχή του πολυσυνδέτη, στην περιοχή των βάσεων 1110-1334, βρίσκεται το σήμα πολυαδενυλίωσης της αυξητικής ορμόνης των βοειδών (bovine Growth Hormone-bGH), που είναι υπεύθυνο για την πολυαδενυλίωση του διαγονιδίου (Εικόνα 17) (<http://www.biofeng.com/zaiti/buru/pcDNA3.1-HisC.html>).



Εικόνα 17: Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1/His A, B και C. Ο φορέας έχει σχεδιαστεί για υψηλού επιπέδου έκφραση και καθαρισμό ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα θηλαστικών και παρέχεται σε τρία πλαίσια ανάγνωσης (A, B, C).

Πηγή: <http://www.biofeng.com/zaiti/buru/pcDNA3.1-HisC.html>



Εικόνα 18: Η πλασμιδιακή κατασκευή *FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C που χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων *HeLa*. Με φούξια χρώμα σημειώνεται το cDNA του *FRA10AC1* που ενσωματώθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1/His C. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το εργαλείο βιοπληροφορικής SnapGene software (Insightful Science, διαθέσιμο στην ιστοσελίδα snapgene.com).

Ανάμεσα στους υποκινητές και την περιοχή του πολυσυνδέτη βρίσκεται το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (ATG) και σε κατάλληλο πλαίσιο ανάγνωσης ο επίτοπος 6xHis (περιοχή βάσεων 932-949), που κωδικοποιεί έξι ιστιδίνες στη χιμαιρική πρωτεΐνη, ο επίτοπος T7 (περιοχή βάσεων 953-985), που κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο 11 αμινοξέων χαρακτηριστικό του γονιδίου 10 του βακτηριοφάγου T7 και ο επίτοπος Xpress (περιοχή βάσεων 989-1112), που κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο 8 αμινοξέων (Εικόνες 17 και 18) (<http://www.biofeng.com/zaiti/buru/pcDNA3.1-HisC.html>).

Ο pcDNA3.1/His A, B και C φέρει μια αλληλουχία έναρξης της αντιγραφής του ιού του πιθήκου 40 σε κύτταρα θηλαστικών (SV40 ori, περιοχή βάσεων 1822-2151), μια αλληλουχία έναρξης της αντιγραφής του (-) κλώνου του πλασμιδίου σε βακτηριακά κύτταρα (ori, περιοχή βάσεων 3758-4346) και μια αλληλουχία έναρξης της αντιγραφής του βακτηριοφάγου f1 (f1 ori, περιοχή βάσεων 1380-1808) για την αντιγραφή του (+) κλώνου του πλασμιδιακού DNA σε βακτηριακά κύτταρα (Εικόνα 18) (<http://www.biofeng.com/zaiti/buru/pcDNA3.1-HisC.html>).

Επιπλέον, φέρει αλληλουχίες δύο γονιδίων αντίστασης σε αντιβιοτικά. Το γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλίνη (AmpR, περιοχή βάσεων 4517-5377) εκφράζεται υπό την επίδραση του βακτηριακού υποκινητή AmpR promoter (περιοχή βάσεων 5378-5482) και χρησιμοποιείται για την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων. Η αμπικιλίνη συνδέεται σε πρωτεΐνες δέσμησης πενικιλίνης που βρίσκονται μέσα στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα, αναστέλλοντας το τρίτο και τελευταίο στάδιο της σύνθεσης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (DrugBank 5.0, 2017). Το γονίδιο αντίστασης στη νεομυκίνη (NeoR/KanR, βάσεις 2218-3012) χρησιμεύει στην επιλογή των ευκαρυωτικών κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί από το πλασμίδιο. Η νεομυκίνη προσδένεται στην υπομονάδα 30 S του ριβοσώματος, δημιουργώντας λάθη στην πρωτεϊνοσύνθεση και αναστέλλοντάς την (DrugBank 5.0, 2017). Πριν το γονίδιο αντίστασης στη νεομυκίνη, στην περιοχή των βάσεων 1822-2151, βρίσκεται ο εκκινητής και ο υποκινητής του ιού του πιθήκου (SV40 promoter) και στην περιοχή 3186-3307 η αλληλουχία σήματος πολυαδενυλίωσης του ιού του πιθήκου (SV40 poly(A) signal), που είναι υπεύθυνη για την πολυαδενυλίωση του μεταγράφου που παράγεται (Εικόνα 18) (<http://www.biofeng.com/zaiti/buru/pcDNA3.1-HisC.html>).

Για τη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων *HeLa* με στόχο την υπερέκφραση του γονιδίου *FRA10AC1* χρησιμοποιήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή *FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C (Εικόνα 18). Το πλασμίδιο αυτό κατασκευάστηκε στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της Σαραφίδου (2004). Για την κατασκευή του

χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1/His C και η περιοχή βάσεων 189-1137 του πλήρους μήκους cDNA του *FRA10AC1*. Το ένθεμα του cDNA του *FRA10AC1* κλωνοποιήθηκε στον πολυσυνδέτη του πλασμιδιακού φορέα pcDNA3.1/His C, στη θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού *EcoRI* (1034) (Σαραφίδου, Διδακτορική Διατριβή, 2005).

Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος DNA και RNA

Χρήση φασματοφωτόμετρου Quawell Q5000 (Thermo Fisher Scientific)

Το Quawell 5000 είναι ένα φασματοφωτόμετρο με ικανότητα εκπομπής ακτινοβολίας με μήκος κύματος 200-850 nm (Εικόνα 19). Το φασματοφωτόμετρο λειτουργεί με τεχνολογία υγρής χρωματογραφίας στήλης και μπορεί να μετρήσει συγκέντρωση και καθαρότητα σε δείγματα όγκου 0,5-2,5 μl με υψηλό βαθμό ακρίβειας και επαναληψιμότητα. Το φασματοφωτόμετρο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της συγκέντρωσης και της καθαρότητας διαλυμάτων νουκλεϊκών οξέων, ενδογενών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών συνδεδεμένων με φθορίζουσες ομάδες. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση μικροσυστοιχιών, τη μέτρηση της πυκνότητας καλλιιεργειών κυττάρων και μικροοργανισμών, καθώς και ως γενικής χρήσης φασματοφωτόμετρο ορατού και υπεριώδους φωτός (<http://photos.labwrench.com/equipmentManuals/5305-1825.pdf>). Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιείται αποστειρωμένο νερό ή το διάλυμα που έχει χρησιμοποιηθεί για την αραίωση του δείγματος.



Εικόνα 19: Το φασματοφωτόμετρο Quawell 5000. Το φασματοφωτόμετρο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό και ποιοτικό έλεγχο διαλυμάτων DNA, RNA και πρωτεϊνών. Πηγή: <http://photos.labwrench.com/equipmentManuals/5305-1825.pdf>

Τα νουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA) παρουσιάζουν μέγιστη οπτική απορρόφηση στα 260 nm, ενώ τα πολυπεπίδια στα 280 nm. Η οπτική πυκνότητα των διαλυμάτων διαφορετικής συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων εξαρτάται από τη φύση των οξέων (DNA, RNA), αν πρόκειται για μονόκλωνα ή δίκλωνα μόρια και τη σύσταση των

βάσεων (Tataurov, et al., 2008). Η μέτρηση της συγκέντρωσης του μορίου γίνεται βάσει της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος στα 260 nm, επιλέγοντας το είδος των μορίων για τα οποία επιθυμείται να υπολογιστεί η συγκέντρωση, δηλαδή αν πρόκειται για διάλυμα DNA ή RNA, μονόκλωνο ή δίκλωνο, ώστε να γίνει κανονικοποίηση της τιμής της οπτικής πυκνότητας που λαμβάνεται.

Ο έλεγχος της καθαρότητας του δείγματος γίνεται υπολογίζοντας το λόγο της οπτικής πυκνότητας του δείγματος στα 260 και 280 nm. Η βέλτιστη τιμή λόγου που λαμβάνεται σε καθαρό διάλυμα του μορίου για δείγματα DNA είναι 1,8 και για RNA 2,00. Όταν λαμβάνονται τιμές λόγου μικρότερες από τις βέλτιστες σημαίνει ότι στο διάλυμα των νουκλεϊκών οξέων υπάρχει πρόσμιξη πρωτεϊνών ή φαινόλης (Barbas, et al., 2007).

Το φασματοφωτόμετρο Quawell 5000 χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτική και ποιοτική αξιολόγηση διαλυμάτων πλασμιδίου και εκχυλίσματος DNA και RNA από κλώνους κυττάρων *HeLa*. Για τη φασματοφωτομέτρηση χρησιμοποιήθηκε 1 μl από το δείγμα και ως τυφλό διάλυμα το διάλυμα στο οποίο ήταν αραιωμένο το προς μέτρηση μόριο, δηλαδή miliQ H₂O για δείγματα RNA και Tris-EDTA (TE) για δείγματα DNA.

Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος διαχωρισμού, ταυτοποίησης και απομόνωσης τμημάτων DNA και RNA ποικίλων μεγεθών, από 100 bp έως 25 kb. Η αγαρόζη απομονώνεται συνήθως από τη γέλη των φυκών των γενών *Gelidium* και *Gracilaria*, που ανήκουν στα ροδόφυτα και αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μόρια αγαροβιόζης, η οποία περιέχει D-γαλακτόζη και ομάδες 3,6-άνυδρο-L-γαλακτόζης. Κατά τη δημιουργία του πηκτώματος, τα πολυμερή αγαρόζης συνδέονται μη ομοιοπολικά και σχηματίζουν ένα δίκτυο δεσμών. Οι ιδιότητες διαπερατότητας του πηκτώματος σε μόρια καθορίζεται από τα μεγέθη των πόρων που δημιουργούνται (Lee, et al., 2012).

Για να διαχωριστεί το DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, το διάλυμα του DNA τοποθετείται σε ειδικά φρεάτια στην άκρη του πηκτώματος και εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο. Ο φωσφορικός σκελετός των νουκλεϊκών οξέων είναι αρνητικά φορτισμένος, επομένως, με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, τα νουκλεϊκά οξέα μετακινούνται προς το θετικά φορτισμένο πόλο. Επειδή τα νουκλεϊκά οξέα έχουν ομοιόμορφη αναλογία μάζα προς φορτίο, τα μόρια διαχωρίζονται εντός του

πηκτώματος κατά μέγεθος. Η μετακίνηση γίνεται σχηματίζοντας ένα πρότυπο, όπου η διανυθείσα απόσταση είναι αντιστρόφως ανάλογη με το λογάριθμο του μοριακού βάρους του μορίου (Helling, et al., 1974). Ο ρυθμός μετακίνησης ενός μορίου νουκλεϊκού οξέος μέσω του πηκτώματος αгарόζης εξαρτάται από τα ακόλουθα (Smith, et al., 1989):

- Το μέγεθος του μορίου
- Τη συγκέντρωση της αгарόζης
- Τη διαμόρφωση του μορίου (κυκλικό, γραμμικό, μονόκλωνο, δίκλωνο)
- Την εφαρμοζόμενη τάση
- Την παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου
- Τον τύπο της αгарόζης
- Το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης

Για την παρασκευή πηκτώματος αгарόζης διαλύεται κατάλληλη ποσότητα αгарόζης, ανάλογα με την επιθυμητή πυκνότητα της γέλης (0.5%-2%), σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-Borate-EDTA (TBE) 1x pH 8.3. Το TBE παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 5x διαλύοντας 54 g Tris base, 27.5 g boric acid και 3.72 g Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) σε 1 L νερό και η ρύθμιση του pH γίνεται με προσθήκη 6 N HCl. Η συγκέντρωση της αгарόζης στο τελικό διάλυμα εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν.

Το διάλυμα τοποθετείται σε κωνική φιάλη ή ποτήρι ζέσεως -τουλάχιστον τριπλάσιας χωρητικότητας από τον όγκο του διαλύματος- και θερμαίνεται αναδεύοντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι την πλήρη διάλυση της αгарόζης. Στη συνέχεια, μειώνεται η θερμοκρασία του διαλύματος με τρεχούμενο νερό βρύσης και προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0.5 μg / ml. Το διάλυμα αναδεύεται, τοποθετείται σε ειδικό εκμαγείο με χτενάκι για τη δημιουργία των φρεατίων τοποθέτησης των δειγμάτων και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να πήξει η γέλη. Όταν ολοκληρωθεί η πήξη, προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x pH 8.3 σε επαρκή ποσότητα, ώστε να καλύπτει πλήρως το πήκτωμα και αφαιρείται το χτενάκι. Το ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση για να διατηρεί σταθερά ουδέτερο το pH και το DNA διαλυτό. Το EDTA είναι χηλικός παράγοντας δισθενών ιόντων, όπως το Mg^{+2} , και προστατεύει τα νουκλεϊκά οξέα από ενζυμική πέψη (Brody & Kern, 2004).

Το δείγμα DNA ή RNA αραιώνεται σε τελική συγκέντρωση 200-300 ng σε αποστειρωμένο νερό και προστίθεται χρωστική Orange G με αραιώση 5 φορές. Η χρωστική χρησιμοποιείται για να αυξήσει το ιξώδες του διαλύματος, αποτρέποντας την ύπαρξη διαρροών δείγματος κατά το φόρτωμα. Παράλληλα, επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης, αφού μετακινείται στο πήκτωμα με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου με ταχύτητα αντίστοιχη ενός μορίου DNA μεγέθους 50 bp. Τα αραιωμένα δείγματα θερμαίνονται στους 65 °C για περίπου 5 min για να αποδιαταχθούν τα μόρια και να διαχωριστούν στο πήκτωμα βάσει του μεγέθους τους. Έπειτα, τα δείγματα ψύχονται και φορτώνονται στα φρεάτια του πηκτώματος. Για την έναρξη της ηλεκτροφόρησης τα ηλεκτρόδια συνδέονται στη συσκευή, με την άνοδο (μαύρο καλώδιο) να τοποθετείται πλησιέστερα στα φρεάτια και την κάθοδο (κόκκινο καλώδιο) μακρύτερα και εφαρμόζεται τάση (40-90 V). Τα μόρια του DNA είναι αρνητικά φορτισμένα -λόγω του φωσφορικού σκελετού- επομένως μετακινούνται προς την κάθοδο. Η ηλεκτροφόρηση ολοκληρώνεται όταν η χρωστική έχει μετακινηθεί επαρκώς, υποδεικνύοντας τη μετακίνηση και των μορίων DNA.

Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, αναστέλλεται η εφαρμογή τάσης, αφαιρούνται τα ηλεκτρόδια από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και το πήκτωμα μεταφέρεται σε τράπεζα UV. Το βρωμιούχο αιθίδιο που περιέχεται στο πήκτωμα αгарόζης είναι θετικά φορτισμένο και συμπλοκοποιείται με το DNA. Οι αρωματικοί δακτύλιοι που φέρει απορροφούν την ακτινοβολία UV και την επανεκπέμπουν με τη μορφή φωτονίων (φθορισμός), επιτρέποντας την οπτικοποίηση των ζωνών DNA στο πήκτωμα.

Για να ταυτοποιηθεί το μέγεθος των μορίων που σχηματίζουν ζώνες στο πήκτωμα, μαζί με τα προς μελέτη δείγματα ηλεκτροφορείται και ένας μάρτυρας μοριακών μεγεθών, που είναι ένα μείγμα μορίων DNA με γνωστά μεγέθη. Οι μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι: α) 1kb Plus DNA Ladder, β) 100bp DNA Ladder, γ) pcDNA3.1His B x *Dde*I, δ) λ DNA x *Hind*III.

Πέψη πλασμιδιακού DNA

Η πέψη του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό έλεγχο του πλασμιδιακού φορέα και για γραμμοποίησή του. Τα κυκλικά μόρια DNA μετακινούνται στο πήκτωμα αгарόζης με μεγαλύτερη ταχύτητα από τα γραμμικά ίδιου μεγέθους, επομένως, για να προσδιοριστεί το μέγεθός τους γίνονται πέψεις ελέγχου.

Μικρή ποσότητα πλασμιδιακού DNA πέπτεται με ένζυμο περιορισμού που αναγνωρίζουν το ένζυμο σε συγκεκριμένες θέσεις και ελέγχεται αν το μέγεθος των τμημάτων που λαμβάνεται είναι το αναμενόμενο.

Η γραμμοποίηση του πλασμιδιακού DNA πριν τη διαμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων αυξάνει την απόδοση της διαμόλυνσης, δηλαδή τον αριθμό των κυττάρων που έχουν ενσωματώνουν και εκφράζουν σταθερά τον πλασμιδιακό φορέα. Επιπλέον, όταν η διαμόλυνση γίνεται με κυκλικό πλασμίδιο, προκειμένου αυτό να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου, θα τεμαχιστεί τυχαία για να γραμμοποιηθεί και να μπορέσει να ενσωματωθεί. Ο τεμαχισμός είναι πιθανό να γίνει σε αλληλουχία απαραίτητη για την έκφραση του διαγονιδίου ή του γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό επιλογής. Η γραμμοποίηση του πλασμιδιακού DNA πριν τη διαμόλυνση οδηγεί σε στοχευμένη γραμμοποίηση της πλασμιδιακής κατασκευής με τεμαχισμό σε περιοχή που δεν είναι απαραίτητη για την έκφραση των γονιδίων ενδιαφέροντος (Stuchbury & Münch, 2010).

Το ένζυμο περιορισμού που επιλέγεται για τον τεμαχισμό της πλασμιδιακής κατασκευής που θα χρησιμοποιηθεί για τη διαμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων θα πρέπει να τέμνει το πλασμίδιο σε μία μόνο θέση, χωρίς να επηρεάζει την έκφραση του διαγονιδίου ή του γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό επιλογής (νεομυκίνη) των διαμολυσμένων ευκαρυωτικών κυττάρων. Χρησιμοποιώντας το εργαλείο βιοπληροφορικής SnapGene software (Insightful Science, διαθέσιμο στην ιστοσελίδα snapgene.com) έγινε κατασκευή του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής *FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C και αναζήτηση των ενζύμων περιορισμού που πληρούν τις παραπάνω προϋποθέσεις. Για τη γραμμοποίηση του πλασμιδιακού φορέα επιλέχθηκε το ένζυμο περιορισμού *ScaI*, που τέμνει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στη θέση 6056 (Εικόνα 18), στην περιοχή του γονιδίου ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Το γονίδιο αυτό χρησιμεύει στην επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων και δεν είναι απαραίτητο για τη διαμόλυνση ή την επιλογή των διαμολυσμένων ευκαρυωτικών κυττάρων.

Η πέψη γίνεται σε τελικό όγκο 20 μl για έλεγχο της πλασμιδιακής κατασκευής και σε 40-50 μl για παρασκευή γραμμοποιημένου πλασμιδιακού DNA. Το διάλυμα της πέψης περιλαμβάνει: ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) 10x, αλβουμίνη ορού βοοειδών (Bovine Serum Albumin-BSA) 10x, ένζυμο περιορισμού, πλασμιδιακό DNA και αποστειρωμένο miliQ H₂O. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι κατάλληλο για το ένζυμο περιορισμού που έχει επιλεγεί, ώστε να προσφέρει τις

βέλτιστες συνθήκες για να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση της πέψης. Το BSA συμβάλλει στη σταθεροποίηση του ενζύμου περιορισμού κατά τη διάρκεια της επώασης και δεν αντιδρά με ένζυμο που δεν απαιτούν σταθεροποιητικό παράγοντα για να δράσουν. Η ποσότητα του ενζύμου που θα χρησιμοποιηθεί, η θερμοκρασία και ο χρόνος προσαρμόζονται για το ένζυμο περιορισμού, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για τη γραμμοποίηση 14 µg του πλασμιδιακού φορέα *FRA10ACI*-pcDNA3.1/His C με *ScaI* χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα 10x NEBuffer 3 και 4 λ ενζύμου περιορισμού (10 U / µl). Η πέψη πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο στους 37 °C ολονύκτια. Ο έλεγχος της απόδοσης της πέψης γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 0.8%, με εφαρμογή τάσης 40 V. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε κατάλληλος μάρτυρας μεγεθών (1kb Plus DNA Ladder) και άκοπο πλασμιδιακό DNA για τη σύγκριση του προτύπου ζωνώσεων. Μετά την επίτευξη της μέγιστης απόδοσης της πέψης, τα προϊόντα φυλάσσονται στους -20 °C.

Απομόνωση γραμμοποιημένου πλασμιδιακού DNA από το μείγμα της πέψης

Για τη διαμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων με το γραμμοποιημένο πλασμίδιο, θα πρέπει να γίνει απομόνωσή του από το μείγμα της πέψης. Αυτό είναι απαραίτητο, διότι η πέψη μπορεί να μην έχει πλήρη απόδοση και θα πρέπει να διαχωριστεί το γραμμοποιημένο από το άκοπο πλασμιδιακό DNA. Επιπλέον, το γραμμοποιημένο πλασμίδιο βρίσκεται σημαντικά αραιωμένο στην παρασκευαστική πέψη και ο όγκος του διαλύματος πλασμιδίου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων είναι περιορισμένος. Τέλος, το διάλυμα της πέψης περιέχει συστατικά που μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης.

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA, το μείγμα της πέψης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αгарόζης 0.8% με εφαρμογή τάσης 40 V. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται κατάλληλος μάρτυρας μεγεθών (1kb Plus DNA Ladder), άκοπο και τεμαχισμένο πλασμιδιακό DNA για τη σύγκριση του προτύπου ζώνωσης.

Για την απομόνωση του γραμμοποιημένου πλασμιδιακού DNA από το πήκτωμα αгарόζης χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel Γερμανίας, Cat.No 740609.10). Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αгарόζης μεταφέρεται σε αποστειρωμένη τράπεζα UV.

Η ένταση της ακτινοβολίας ρυθμίζεται στο ελάχιστο δυνατό, καθώς η εκτεταμένη έκθεση σε ακτινοβολία UV μπορεί να προκαλέσει θραύσεις στο DNA. Με τη χρήση αποστειρωμένης λεπίδας αποκόπτεται το τμήμα του πηκτώματος που περιέχει το γραμμοποιημένο πλασμιδιακό DNA -αφαιρώντας όση αγαρόζη εξέχει- και τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα falcon 15 ml. Για κάθε 100 mg αγαρόζης < 2% προστίθενται 200 µl Buffer NT1. Το μείγμα θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 50 °C για 5-10 min, αναδεύοντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα, μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση της αγαρόζης. Στη συνέχεια, φορτώνονται 700 µl από το διάλυμα σε στήλη NucleoSpin® and PCR Clean-up Column με δοχείο συλλογής και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 30 sec έως 1 min. Το DNA δεσμεύεται στη στήλη και το υγρό που βρίσκεται στο δοχείο συλλογής απορρίπτεται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να διαπεράσει τη στήλη όλο το διάλυμα αγαρόζης. Έπειτα, γίνεται εις διπλούν πλύση της στήλης με 700 µl διάλυμα πλύσης (Buffer NT3 αραιωμένο σε 96-100% αιθανόλη (EtOH) σε αναλογία 1:4) και φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 30 sec έως 1 min. Η EtOH κατακρημνίζει το DNA δεσμεύοντάς το στη στήλη, ενώ το Buffer NT3 αφαιρεί τυχόν υπολείμματα αγαρόζης και Buffer NT1. Για αποτελεσματικότερη αφαίρεση της αγαρόζης, μετά τις φυγοκεντρήσεις η στήλη επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 70 °C για 5 min. Για την έκλυση του DNA από τη στήλη τοποθετείται νέο δοχείο συλλογής και προστίθενται 20 µl διαλύματος έκλυσης (Buffer NE). Η στήλη επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min για να διαλυθεί το DNA και φυγοκεντρείται στα 13000 rpm για 30 sec έως 1 min. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται χρησιμοποιώντας 10 µl Buffer NE. Το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA ελέγχεται ποσοτικά και ποιοτικά με φασματοφωτομέτρηση και ηλεκτροφόρηση.

Καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων *HeLa*

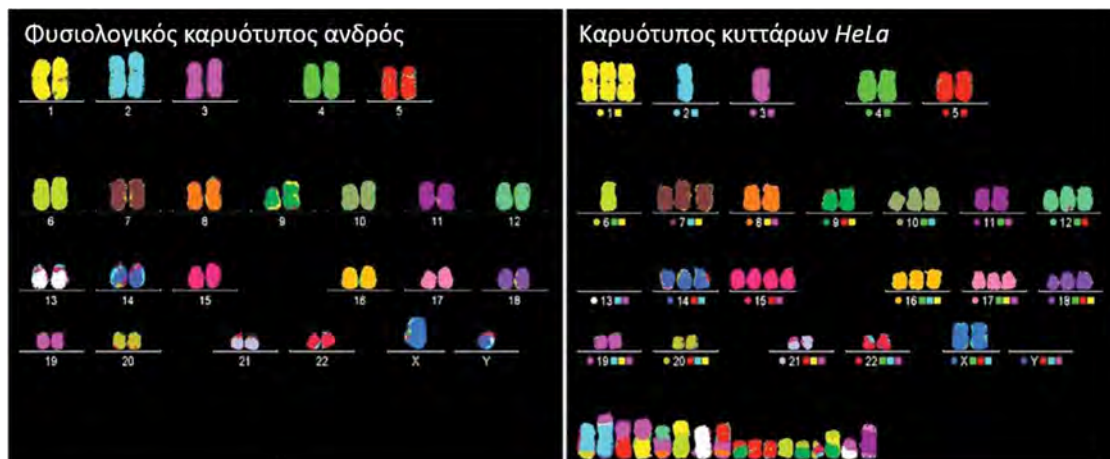
Η κυτταρική καλλιέργεια είναι η κατανομή των κυττάρων σε ένα τεχνητό περιβάλλον (in vitro), στο οποίο παρέχονται τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, ιδανική θερμοκρασία, κατάλληλη σύσταση αερίων, pH και υγρασία, επιτρέποντας την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η καλλιέργεια κυττάρων είναι πολύ σημαντική, αφού δίνει τη δυνατότητα κατανόησης της συμπεριφοράς τους και της μελέτης των συστατικών τους. Επιπλέον, η μελέτη μεμονωμένων κυττάρων περιορίζει τη χρήση πειραματόζων, υπερπηδώντας ηθικά ζητήματα, ενώ περιορίζονται

σημαντικά ο χρόνος και το κόστος της μελέτης. Στον εργαστηριακό τομέα καλλιεργούνται συνήθως αθανатоποιημένα κύτταρα που προέρχονται από καρκινικούς όγκους ή παράγονται με ειδική επεξεργασία φυσιολογικών κυττάρων μετά από ιική μόλυνση.

Η ιστορία των κυττάρων *HeLa*

Τα κύτταρα *HeLa* είναι κύτταρα προερχόμενα από επιθετικό αδenoκαρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας, μιας γυναίκας με το όνομα Henrietta Lacks (από το ακρώνυμο του ονόματός της ονομάστηκαν τα κύτταρα *HeLa*). Την περίοδο που η Henrietta Lacks παρακολουθούνταν στη Γυναικολογική Κλινική του Johns Hopkins στη Βαλτιμόρη του Μέριλαντ, ένας γιατρός του νοσοκομείου είχε ως στόχο την απομόνωση και διατήρηση κανονικών και κακοήθων κυτταρικών στελεχών (Gey, 1955). Για το σκοπό αυτό, ο Δρ. Gey και οι συνάδελφοί του συνέλεξαν ιστούς από χειρουργικές επεμβάσεις που πραγματοποιούνταν στο νοσοκομείο. Ένα από τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν και το δείγμα βιοψίας από το καρκίνωμα της Henrietta Lacks. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι τα κύτταρα αναπτύσσονταν ραγδαία, αντίθετα με κύτταρα που προέρχονταν από άλλα δείγματα, καθιστώντας τα *HeLa* την πρώτη ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά που αθανατοποιήθηκε σε καλλιέργεια (Brendan, et al., 2009).

Η ανάλυση καρυοτύπου των κυττάρων *HeLa* δείχνει τη δραματική μεταλλαξιγένεση που έχουν υποστεί τα κύτταρα. Πολλά χρωμοσώματα περιέχουν περισσότερα από δύο αντίγραφα και μεγάλες χρωμοσωμικές περιοχές έχουν υποστεί διπλασιασμούς. Επιπλέον, υπάρχουν πολλά υβριδοποιημένα χρωμοσώματα που προέρχονται από την αναδιάταξη διαφόρων τμημάτων χρωμοσωμάτων, αλλάζοντας ριζικά τη διάταξη των γονιδίων στο γονιδίωμα των κυττάρων (Εικόνα 20). Παρά τη σημαντική μεταλλαξιγένεση που παρατηρείται στο γονιδίωμα των κυττάρων *HeLa*, οι επιστήμονες τα χρησιμοποιούν ευρέως σε πειράματα, καθώς θεωρείται ότι η φυσιολογία τους προσομοιάζει αυτή των φυσιολογικών κυττάρων.



Εικόνα 20: Αριστερά: **Φυσιολογικός καρυότυπος ανδρός**. Δεξιά: **Ο καρυότυπος των κυττάρων *HeLa***. Ο καρυότυπος των κυττάρων *HeLa* διαφέρει σημαντικά από τα φυσιολογικά κύτταρα, αφού φέρει περισσότερα από δύο αλληλόμορφα για κάθε χρωμόσωμα, ενώ επιπλέον υπάρχουν πολλά υβριδικά χρωμοσώματα που προέρχονται από την αναδιάταξη τμημάτων διαφόρων χρωμοσωμάτων. Πηγή: <http://helacellblog2.blogspot.com/2015/01/4.html>

Υλικά για την καλλιέργεια κυττάρων *HeLa*

Τα κύτταρα *HeLa* καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία (Petri dishes) διαμέτρου 10 cm, σε φλάσκες (Flasks) 25 cm² και 75 cm² και σε τρυβλία 6 και 12 θέσεων (well plates). Όλα τα δοχεία καλλιέργειας των κυττάρων είναι επιστρωμένα εσωτερικά με πολυστυρόλιο, για την επιτυχή προσκόλληση των κυττάρων *HeLa* στον πάτο του δοχείου. Η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται σε ειδικό δωμάτιο (cell culture room), όπου επικρατούν άσηπτες συνθήκες για την αποφυγή μόλυνσης των καλλιεργειών. Η επώαση των καλλιεργειών πραγματοποιείται σε κλίβανο (incubator), ο οποίος παρέχει στα κύτταρα βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης: θερμοκρασία 37 °C, κατάλληλο ποσοστό υγρασίας και συγκέντρωση CO₂ 5% για τη διατήρηση του κατάλληλου pH. Όλες οι διεργασίες χειρισμού των κυτταροκαλλιεργειών γίνονται μέσα σε εστία νηματικής ροής (flow laminar hood) με άσηπτες συνθήκες. Η εστία αυτή προστατεύει το χώρο εργασίας με συνεχή ροή αέρα, περιορίζοντας τις πιθανότητες μόλυνσης των καλλιεργειών.

Ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε το Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) των εταιρειών Gibco® (Cat.No 41966-029) και Biosera (Cat.No LM-D1109/500). Το θρεπτικό μέσο περιέχει υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης και γλουταμινικού, απαραίτητα στοιχεία για το μεταβολισμό των κυττάρων, αμινοξέα, βιταμίνες και ανόργανα άλατα. Επιπλέον, περιέχει το δείκτη ερυθρό της φαινόλης (Phenol Red), ο οποίος μεταβάλλει το χρώμα του θρεπτικού μέσου ανάλογα με την τιμή του pH. Σε φυσιολογικές συνθήκες

pH 7-7.4, το DMEM είναι κόκκινο. Όταν στο θρεπτικό μέσο αυξάνεται υπέρμετρα ο αριθμός των κυττάρων και συσσωρεύονται μεταβολικά προϊόντα, μειώνεται η τιμή του pH (< 6.8) και το χρώμα του θρεπτικού μέσου γίνεται κίτρινο. Όταν το θρεπτικό μέσο έχει μειωμένη συγκέντρωση CO₂ ή το pH είναι βασικό (> 8.2), το χρώμα του θρεπτικού μέσου γίνεται μωβ.

Για την καλλιέργεια των κυττάρων στο θρεπτικό μέσο DMEM προστίθεται ορός βοδινού (Fetal Bovine Serum-FBS) της Biosera (FB-1001/500(B16941)) και κατάλληλο αντιβιοτικό, όταν είναι απαραίτητο. Πριν τη χρήση του, το FBS αποψύχεται και θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 56 °C για 30 min, αναδεύοντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Η διαδικασία αυτή εφαρμόζεται για να αδρανοποιηθεί το συμπλήρωμα, μια ομάδα πρωτεϊνών του ανοσοποιητικού συστήματος και να καταστραφούν τυχόν υπολείμματα μυκοπλάσματος (https://www.lgcstandards-atcc.org/support/faqs/ff985/Purpose+of+heat-inactivating+serum-154.aspx?geo_country=gr). Μετά τη διαδικασία της αδρανοποίησης φυλάσσεται στους -20 °C. Το FBS προστίθεται στο θρεπτικό μέσο σε τελική συγκέντρωση 10%, παρέχοντας στα κύτταρα πρωτεΐνες, λιπίδια και αυξητικούς παράγοντες, απαραίτητα για την ανάπτυξή τους.

Για την αποφυγή μόλυνσης της καλλιέργειας από βακτήρια, στο θρεπτικό μέσο προστίθεται μείγμα αντιβιοτικών στρεπτομυκίνης και πενικιλίνης (PenStrept, Biosera, XC-A4122/100) σε τελική συγκέντρωση 1%. Η πενικιλίνη είναι μια ομάδα αντιβιοτικών που καταπολεμούν τα βακτήρια, αναστέλλοντας τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, η οποία χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (Mucsi, et al., 2013). Η στρεπτομυκίνη είναι ένα αντιβιοτικό που δρα ως αναστολέας της πρωτεϊνολύσεως, δεσμεύοντας το 16 S rRNA της υπομονάδας 30 S του βακτηριακού ριβοσώματος (Sharma, et al., 2007).

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα *HeLa* που έχουν διαμολυνθεί και εκφράζουν τον πλασμιδιακό φορέα *FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C, εκφράζουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη. Έτσι, για την επιλογή των διαμολυσμένων κυττάρων *HeLa*, στο θρεπτικό μέσο προστίθεται το αντιβιοτικό επιλογής γενετισίνη (G418) (Clontech, Cat.No 631308) σε συγκέντρωση 500 µg / ml. Η γενετισίνη διαλύεται σε αποστειρωμένο miliQ H₂O και φυλάσσεται σε στοκ συγκέντρωσης 200 mg / ml στους -20 °C. Στο θρεπτικό μέσο προστίθεται κάθε φορά ένα είδος αντιβιοτικού, διότι το

PenStrept αποτελεί ανταγωνιστικό αναστολέα του G418 και η ταυτόχρονη χρήση θα παρεμποδίσει την επιλογή των διαμολυσμένων ευκαρυωτικών κυττάρων.

Τα κύτταρα *HeLa* που καλλιεργούνται σε τρυβλία και φλάσκες προσκολλώνται στο υπόστρωμα μέσω μορίων προσκόλλησης και ιντεγκρίνες που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων, δημιουργώντας μονόστιβα στρώματα. Για να ανακαλλιεργηθούν, πρέπει να αποκολληθούν από την επιφάνεια καλλιέργειας και αυτό πραγματοποιείται με τη χρήση θρυψίνης-EDTA (Invitrogen® 10x trypsin 5%-EDTA, Cat.No 15400-054). Η θρυψίνη είναι μια πρωτεάση της σερίνης και δρα διασπώντας τους πεπτιδικούς δεσμούς των διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών που συντελούν στην προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα. Το EDTA αναστέλλει τη δράση δισθενών ιόντων, όπως το Ca^{+2} , συμβάλλοντας στην αποκόλληση των κυττάρων. Πριν τη χρήση του, το αρχικό διάλυμα θρυψίνης-EDTA 10x αραιώνεται σε 1x με ισότονο διάλυμα Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x και το αραιωμένο διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C . Τα κύτταρα επωάζονται 5-7 min με το διάλυμα θρυψίνης-EDTA 1x και στη συνέχεια -μόλις αποκολληθούν από το υπόστρωμα- προστίθεται θρεπτικό μέσο για να ανασταλεί η δράση θρυψίνης-EDTA. Η παρατεταμένη επώαση σταδιακά θα οδηγήσει σε καταστροφή και άλλων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών των κυττάρων, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Η θρυψίνη αναστέλλεται από την ύπαρξη του ορού και το EDTA από τα δισθενή ιόντα που υπάρχουν στο θρεπτικό μέσο.

Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα *HeLa* ολοκληρώνουν έναν κυτταρικό κύκλο κάθε 24 ώρες. Οι συνεχείς διαιρέσεις που πραγματοποιούνται οδηγούν σε εκθετική αύξηση του αριθμού των κυττάρων στην κυτταροκαλλιέργεια. Καθώς τα κύτταρα αναπτύσσονται, καταναλώνουν τα θρεπτικά συστατικά και αποβάλλουν τοξικές ουσίες και παραπροϊόντα του μεταβολισμού. Σταδιακά η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών μειώνεται και οι τοξικές ουσίες συσσωρεύονται, δημιουργώντας συνθήκες στρες, με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται οι αποπτωτικοί μηχανισμοί του κυττάρου. Για να αποφευχθεί αυτό, όταν τα κύτταρα καλύπτουν περίπου το 70% της επιφάνειας καλλιέργειας ανακαλλιεργούνται, για να διατηρούνται συνεχώς οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται στην εστία νηματικής ροής σε άσηπτες συνθήκες. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται βρίσκονται σε θερμοκρασία 37°C , για την αποφυγή στρεσαρίσματος των κυττάρων.

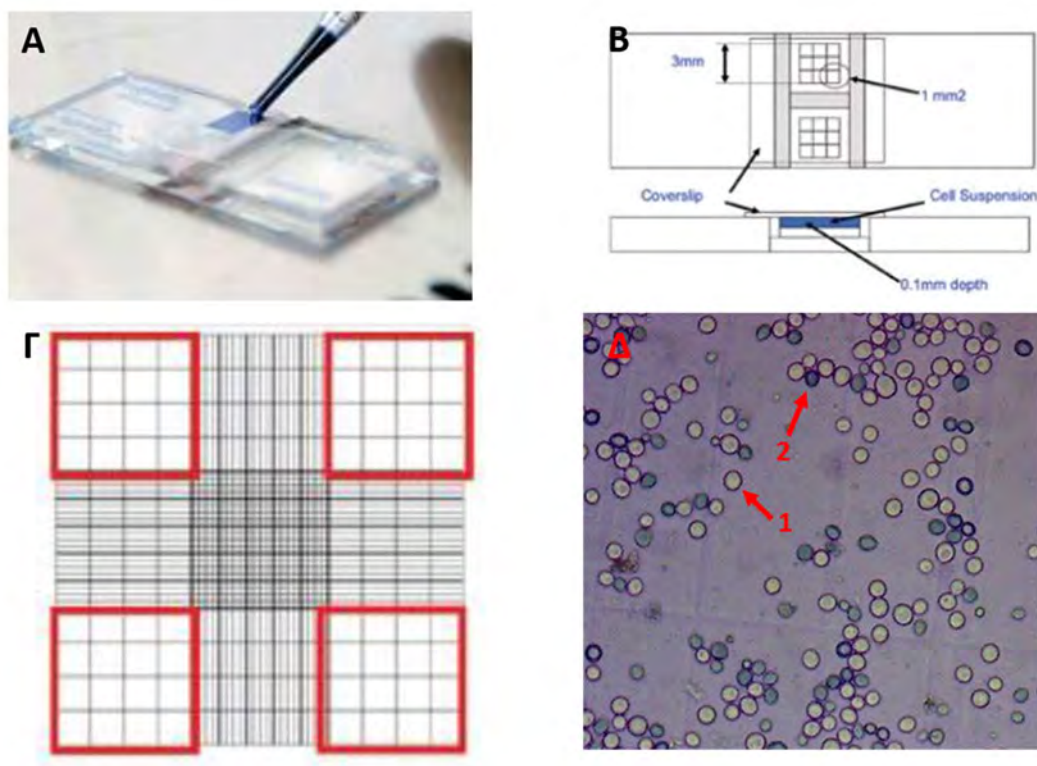
Αρχικά, αναρροφάται το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας και γίνονται δύο πλύσεις με διάλυμα PBS 1x. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος θρυψίνη-EDTA 1x, ώστε να καλύπτεται η επιφάνεια της καλλιέργειας για 5-7 min. Μόλις τα κύτταρα αρχίσουν να αποκολλώνται από την επιφάνεια καλλιέργειας, η θρυψίνη απενεργοποιείται με την προσθήκη θρεπτικού μέσου. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα falcon, φυγοκεντρείται στα 1000 rpm για 5-7 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται (μέχρι το σημείο αυτό η διαδικασία είναι κοινή για όλες τις διαδικασίες επεξεργασίας των κυττάρων που περιγράφονται στη συνέχεια). Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε μικρή ποσότητα θρεπτικού μέσου, η επιθυμητή ποσότητα των κυττάρων τοποθετείται σε νέο δοχείο καλλιέργειας, προστίθεται θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο. Στον Πίνακα 2 περιγράφονται οι συνιστώμενες ποσότητες των διαλυμάτων για κάθε δοχείο καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε.

Πίνακας 2: Οι συνιστώμενες ποσότητες διαλυμάτων, ανάλογα με το δοχείο καλλιέργειας.

	Flask 25 ²	Flask 75 ²	Petri dish Ø 10 cm	6-well plate	12-well plate
Θρεπτικό μέσο (DMEM, FBS, antibiotic)	5 ml	10 ml	8-10 ml	3-4 ml	2 ml
Διάλυμα πλύσης (PBS)	2 ml	4 ml	4 ml	2 ml	1 ml
Διάλυμα θρυψίνη-EDTA 1x	1 ml	2 ml	2 ml	1 ml	0.5 ml

Μέτρηση ζωντανών κυττάρων

Πολλά πειραματικά πρωτόκολλα που πραγματοποιούνται με ευκαρυωτικά κύτταρα απαιτούν τη γνώση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων που υπάρχουν στην καλλιέργεια. Η μέτρηση των ζωντανών κυττάρων γίνεται με διάλυμα χρωστικής trypan blue 0.2% σε PBS 1x και το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Η αρχή μέτρησης των κυττάρων βασίζεται στο ότι η κυτταρική μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων δεν επιτρέπει τη διέλευση της χρωστικής, ενώ τα νεκρά κύτταρα, με αποδιοργανωμένη κυτταρική μεμβράνη, ενσωματώνουν τη χρωστική και βάφονται μπλε (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Η διαδικασία μέτρησης των κυττάρων με τη χρήση χρωστικής trypan blue.

Το διάλυμα 0.2% trypan blue αναμειγνύεται με ίση ποσότητα εναιωρήματος κυττάρων, επωάζεται για περίπου 3 min και τοποθετείται στο αιμοκυτταρόμετρο (Α). Στη συνέχεια, μετράται ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων στα τέσσερα ακριανά τετράγωνα (Γ-επισημαίνονται με κόκκινο πλαίσιο). Τα ζωντανά κύτταρα, των οποίων η κυτταρική μεμβράνη είναι συμπαγής, δεν προσλαμβάνουν τη χρωστική, με αποτέλεσμα να μη βάφονται (Δ-1), ενώ τα νεκρά, των οποίων η κυτταρική μεμβράνη είναι αποδιοργανωμένη, βάφονται μπλε (Δ-2).

Για τη μέτρηση των κυττάρων ακολουθείται το πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας για τη δημιουργία εναιωρήματος κυττάρων. Έπειτα, το διάλυμα trypan blue αναδιαλύεται με ίση ποσότητα εναιωρήματος, επωάζεται για περίπου 3 min και το μείγμα τοποθετείται σε καλά καθαρισμένο αιμοκυτταρόμετρο. Με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου γίνεται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων στα τέσσερα μεγάλα ακριανά τετράγωνα του σχήματος (σημειώνονται με κόκκινο στην Εικόνα 21-Γ).

Κάθε τετράγωνο μέτρησης έχει όγκο 1 mm^2 , επομένως ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων στο αρχικό διάλυμα γίνεται με τον τύπο:

$$\text{Συγκέντρωση ζωντανών κυττάρων} \left(\frac{\text{κύτταρα}}{\text{ml}} \right) = 2 * \frac{\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων}}{\text{αριθμός τετραγώνων που μετρήθηκαν}} * 10^4$$

Αντίστοιχα, η βιωσιμότητα των κυττάρων μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο:

$$\text{Βιωσιμότητα (\%)} = \frac{\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων}}{\text{συνολικός αριθμός ζωντανών και νεκρών κυττάρων}} * 100$$

Κρυοσυντήρηση κυττάρων

Η κρυοσυντήρηση είναι η διαδικασία αποθήκευσης των κυττάρων σε υπερκαταψύκτες στους -80 °C ή στο υγρό άζωτο (-196 °C). Η κρυοσυντήρηση χρησιμοποιείται για την αποφυγή μόλυνσης από μικροοργανισμούς, αλλά κυρίως για να αποφευχθεί η συγκέντρωση γενετικών αλλαγών, το γήρας και η διαφοροποίηση σε κυτταρικές σειρές που καλλιεργούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα κύτταρα συντηρούνται σε διάλυμα που περιέχει ένα κρυοπροστατευτικό μέσο (διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) ή γλυκερόλη) και υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών (FBS), για να προστατευθούν τα κύτταρα από το στρες του παγώματος. Ο κρυοπροστατευτικός παράγοντας μειώνει το σημείο πήξης του θρεπτικού μέσου, επιτρέποντας το σταδιακό πάγωμά του. Απουσία του κρυοπροστατευτικού παράγοντα, το πάγωμα γίνεται γρήγορα, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται κρύσταλλοι στο εσωτερικό των κυττάρων, οι οποίοι μηχανικά μπορούν να καταστρέψουν τις κυτταρικές μεμβράνες. Επιπλέον, η μείωση της συγκέντρωσης του νερού αυξάνει σημαντικά τη συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών, οδηγώντας σε απότομη αφυδάτωση των κυττάρων λόγω του φαινομένου της ώσμωσης. Ο κρυοπροστατευτικός παράγοντας (DMSO) μειώνει το σημείο πήξης, με αποτέλεσμα το πάγωμα των κυττάρων να γίνεται σταδιακά και να σχηματίζονται λιγότεροι κρύσταλλοι. Η ύπαρξη υψηλής συγκέντρωσης πρωτεϊνών (FBS) στο μέσο παγώματος μειώνει το φαινόμενο της ώσμωσης (Pegg, 2007).

Η πιθανότητα επιβίωσης των κυττάρων κατά την κρυοσυντήρηση εξαρτάται από το σχετικό αριθμό των κρυστάλλων νερού που σχηματίστηκαν, τη συγκέντρωση κυττάρων στο μέσο ψύξης (η υψηλή συγκέντρωση των κυττάρων αυξάνει την πιθανότητα σύγκρουσης με κρυστάλλους νερού, καταστρέφοντάς τα), τις θερμοκρασίες στις οποίες εκτέθηκαν τα κύτταρα και τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης. Ο βέλτιστος ρυθμός ψύξης των κυττάρων είναι περίπου 1 °C / min. Τα κύτταρα επωάζονται με κρυοπροστατευτικό παράγοντα αμέσως πριν την πήξη, για να μειωθεί ο χρόνος έκθεσής τους στις τοξικές ιδιότητες του παράγοντα (Pegg, 2007).

Η κρυοσυντήρηση των κυττάρων πραγματοποιείται όταν αυτά καλύπτουν περίπου το 70% της επιφάνειας καλλιέργειας. Ακολουθείται το πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας των κυττάρων και η πελλέτα κυττάρων αναδιαλύεται σε μικρή ποσότητα FBS. Στο εναιώρημα, έπειτα, προστίθεται ο κρυοπροστατευτικός παράγοντας DMSO διαλυμένος σε FBS, ώστε στο τελικό διάλυμα ψύξης η συγκέντρωσή του να είναι 10%. Το εναιώρημα μεταφέρεται σε κρυοσωληνάριο (cryotube) στους -80 °C ολονύκτια και έπειτα στο υγρό άζωτο.

Μετά την κρυοσυντήρηση τα κύτταρα μπορούν να επανακαλλιεργηθούν. Για την απόψυξη των κυττάρων, το κρυοσωληνάριο επάζεται σε υδατόλουτρο στους 37 °C για περίπου 1 min και στη συνέχεια το εναιώρημα μεταφέρεται σε δοχείο καλλιέργειας που περιέχει την επιθυμητή ποσότητα θρεπτικού μέσου. Είναι σημαντικό να γίνει άμεση αραίωση του κρυοπροστατευτικού παράγοντα με θρεπτικό μέσο, ώστε να μειωθεί η έκθεση των κυττάρων στην τοξική του δράση. Επιπλέον, μόλις τα κύτταρα προσκολληθούν στην επιφάνεια του δοχείου, συστήνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου, για να απομακρυνθεί πλήρως το DMSO.

Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων

Διαμόλυνση είναι η διαδικασία εισαγωγής γενετικού υλικού σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Η διαμόλυνση θεωρείται παροδική όταν τα τμήματα DNA που εισέρχονται στο κύτταρο δεν ενσωματώνονται στο γενετικό υλικό του κυττάρου και η έκφρασή τους γίνεται για περιορισμένο χρονικό διάστημα, μέχρι τα μόρια να αποικοδομηθούν. Στη σταθερή διαμόλυνση, το DNA που χρησιμοποιείται για τη διαμόλυνση των κυττάρων ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό και αντιγράφεται ως μέρος αυτού, μεταφέροντας την πληροφορία και στους απογόνους των κυττάρων.

Για τη διαμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο kit Xfect Transfection Reagent (Cat.No 631317). Το kit περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα και λιπιδικά νανοσωματίδια για τη διευκόλυνση της εισόδου του DNA στο εσωτερικό του κυττάρου. Λόγω του αρνητικά φορτισμένου φωσφορικού σκελετού, το DNA είναι υδρόφιλο και δεν μπορεί να διαπεράσει αυθαίρετα την κυτταρική μεμβράνη. Τα λιποσώματα είναι θετικά φορτισμένα λιπιδικής φύσεως νανοσωματίδια. Το θετικό φορτίο επιτρέπει τη συμπλοκοποίηση με το αρνητικά φορτισμένο DNA, ενώ λόγω της λιπιδικής φύσης τους, τα σωματίδια συγχωνεύονται με την κυτταρική μεμβράνη, δημιουργώντας κυστίδιο και επιτρέποντας την είσοδο του DNA στο

κυτταρόπλασμα. Το κυστίδιο -μετά τη διέλευση της κυτταρικής μεμβράνης- διασπάται και το DNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Τα τμήματα του DNA μεταφέρονται στον πυρήνα του κυττάρου και ενσωματώνονται στο γενετικό υλικό με ανασυνδυασμό.

Μια ημέρα πριν τη διαμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων *HeLa* χρησιμοποιώντας το kit Xfect Transfection Reagent Protocol γίνεται ανακαλλιέργεια κυττάρων *HeLa* σε 6-well plate, τοποθετώντας από 1.2×10^5 έως 3×10^5 κύτταρα σε κάθε θέση καλλιέργειας, ώστε την επόμενη μέρα τα κύτταρα να καλύπτουν το 50-70% της επιφάνειας καλλιέργειας. Περίπου δύο ώρες πριν τη διαμόλυνση γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας με θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει αντιβιοτικό (DMEM 90%, FBS 10%) και το ρυθμιστικό διάλυμα (Xfect Reaction Buffer) αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία της διαμόλυνσης. Το Xfect Reaction Buffer αναμειγνύεται με 5 μ g DNA σε τελικό όγκο 100 μ l (το ρυθμιστικό διάλυμα πρέπει να αποτελεί τουλάχιστον το μισό όγκο του τελικού διαλύματος) και αναδεύεται με Vortex για 5 sec. Στο διάλυμα προστίθεται 1.5 μ l διαλύματος λιποσωμάτων (Xfect Polymer), το οποίο έχει ομογενοποιηθεί πλήρως με ανάδευση με Vortex και το νέο διάλυμα αναδεύεται για 10 sec. Έπειτα, αφήνεται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min, ώστε τα λιποσώματα να συμπλοκοποιηθούν με τα μόρια DNA. Το διάλυμα προστίθεται στάγδην στην κυτταροκαλλιέργεια, η οποία επωάζεται ολονύκτια στον επωαστικό θάλαμο, ώστε τα λιποσώματα να ενσωματωθούν στο εσωτερικό των κυττάρων. Την επόμενη ημέρα γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου για την απομάκρυνση των λιποσωμάτων και μετά το πέρας τουλάχιστον 48 h προστίθεται θρεπτικό μέσο με αντιβιοτικό για την επιλογή των διαμολυσμένων κυττάρων (DMEM 90%, FBS 10%, G418 500 μ l / ml).

Διαδικασία επιλογής των κλώνων κυττάρων

Στόχος ήταν η δημιουργία κλώνων κυττάρων *HeLa* που υπερεκφράζουν σταθερά το γονίδιο *FRA10AC1*. Η απομόνωση κλώνων κυττάρων επιλέχθηκε έναντι της χρήσης μείγματος διαμολυσμένων κυττάρων, ώστε κάθε κλώνος να αποτελείται από κύτταρα με το ίδιο γενετικό υπόβαθρο (απόγονοι ενός κυττάρου) και να εκφράζουν το γονίδιο *FRA10AC1* στην ίδια σταθερή ποσότητα. Αυτό είναι απαραίτητο για την επαναληψιμότητα των μετρήσεων έκφρασης και των αποτελεσμάτων των ομικών

αναλύσεων για την παρατήρηση της επίδρασης της υπερέκφρασης του *FRA10AC1* στη φυσιολογία του κυττάρου.

Για τη δημιουργία κλώνων κυττάρων *HeLa*, δύο ημέρες μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων έγινε ανακαλλιέργειά τους σε τρυβλία Petri σε σημαντικά αραιή συγκέντρωση, ώστε να σχηματιστούν διακριτοί κυτταρικοί κλώνοι. Στα τρυβλία Petri προστέθηκε θρεπτικό μέσο με αντιβιοτικό επιλογής, το οποίο επιτρέπει μόνο την ανάπτυξη των διαμολυσμένων κυττάρων *HeLa*. Ταυτόχρονα, έγινε προσθήκη θρεπτικού μέσου επιλογής σε κυτταροκαλλιέργεια που περιέχει κύτταρα *HeLa* αγρίου τύπου, για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας του αντιβιοτικού (κυτταροκαλλιέργεια ελέγχου). Οι κυτταροκαλλιέργειες αφήνονται για επώαση στον επωαστικό θάλαμο για περίπου δύο εβδομάδες, αλλάζοντας το θρεπτικό μέσο κάθε 4-5 ημέρες για να απομακρυνθούν τοξικές ουσίες και παραπροϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων. Μετά από περίπου 12-14 ημέρες, το αντιβιοτικό επιλογής έχει οδηγήσει σε θανάτωση των κυττάρων στην κυτταροκαλλιέργεια ελέγχου, καθώς και των μη διαμολυσμένων κυττάρων στις πειραματικές καλλιέργειες. Τα διαμολυσμένα κύτταρα που έχουν επιβιώσει έχουν διαιρεθεί, σχηματίζοντας διακριτές αποικίες.

Για την απομόνωση των κλώνων κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν κύλινδροι της εταιρείας «Sigma-Aldrich». Αρχικά, σημειώνονται οι αποικίες που θεωρείται ότι αποτελούν διακριτούς κυτταρικούς κλώνους, βάσει του αριθμού των κυττάρων που αποτελούνται και της απόστασής τους από άλλες αποικίες. Μετά από εφαρμογή βαζελίνης στο κάτω μέρος του κυλίνδρου, αυτοί τοποθετούνται μέσα στο τρυβλίο, με τέτοιο τρόπο, ώστε ιδανικά να περικλείουν μία μόνο κυτταρική αποικία. Μέσα στον κύλινδρο εφαρμόζεται το πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας κυττάρων και τα κύτταρα από κάθε κύλινδρο μεταφέρονται για καλλιέργεια σε ξεχωριστά φρεάτια σε 12-well plate.

Ποιοτικός έλεγχος των διαμολυσμένων κυττάρων

Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από κύτταρα *HeLa*

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ακεραιότητα του διαγονιδίου μετά την ενσωμάτωσή του στο γενετικό υλικό των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με ειδικούς εκκινητές για το διαγονίδιο, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα γονιδιωματικό DNA από διαμολυσμένα κύτταρα. Χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας των κυττάρων γίνεται συλλογή πελλέτας κυττάρων από τρυβλίο Petri διαμέτρου 10 cm.

Η πελλέτα επωάζεται ολονύκτια στους 55 °C μετά από προσθήκη 500 µl διαλύματος Proteinase K 100 µg / ml. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται από αραιώση διαλύματος στοκ, που περιέχει Proteinase K 10 mg / ml σε ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0 και 0.5% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Η πρωτεϊνάση πέπτει τις πρωτεΐνες του κυττάρου. Σε περίπτωση που το ιξώδες του διαλύματος μετά την ολονύκτια επώαση παραμένει υψηλό, γίνεται προσθήκη επιπλέον ποσότητας διαλύματος Proteinase K 100 µg / ml και επώαση για διάστημα λίγων ωρών. Στο διάλυμα στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 500 ml φαινόλης και φυγοκεντρείται για 10 min στα 10000 rpm. Η φαινόλη προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών του εκχυλίσματος, ενώ παράλληλα επιτρέπει το διαχωρισμό της υδατικής φάσης, όπου βρίσκονται διαλυμένα τα νουκλεϊκά οξέα από την οργανική φάση, όπου βρίσκονται τα λιπίδια. Έπειτα, προστίθενται 500 ml χλωροφόρμιο και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10 min στα 10000 rpm. Το χλωροφόρμιο ενισχύει τη δράση της φαινόλης, συμβάλλει στο διαχωρισμό της υδατικής από την οργανική φάση και διασπά τα λιπίδια. Το υπερκείμενο που αποτελείται από την υδατική φάση και εκεί βρίσκονται διαλυμένα τα νουκλεϊκά οξέα μεταφέρεται σε νέο δοχείο Eppendorf. Σε αυτό γίνεται προσθήκη 3 M CH₃COONa pH 5.2 σε ποσότητα 1/10 του όγκου του υπερκειμένου και 100% EtOH σε ποσότητα 2.5 φορές του όγκου του υπερκειμένου. Το διάλυμα αναδεύεται έντονα και επωάζεται για λίγα λεπτά στους -20 °C. Μετά την επώαση πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 12000 rpm για 15 min και απόρριψη του υπερκειμένου. Η πελλέτα πλένεται με 700 µl 70% EtOH, φυγοκεντρείται στα 12000 rpm για 15 min και απορρίπτεται εκ νέου το υπερκείμενο. Το δοχείο που περιέχει την πελλέτα καλύπτεται με παραφίλμ, στο οποίο δημιουργούνται μικροί πόροι με τη χρήση βελόνας, και τοποθετείται σε θάλαμο θερμοκρασίας 37 °C μέχρι να γίνει πλήρης εξάτμιση της EtOH. Η πελλέτα, στη συνέχεια, επαναδιαλύεται σε 100 µl αποστειρωμένο TE, ψύχεται στους 4 °C για λίγες ώρες για να διαλυθεί το DNA και στη συνέχεια αποθηκεύεται στους -80 °C.

Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα *HeLa*

Για την εκτίμηση της έκφρασης του διαγονιδίου σε επίπεδο μεταγράφου έγινε απομόνωση του ολικού RNA των κυττάρων *HeLa* χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο kit NucleoZOL (MachereyNagel Γερμανίας, Cat.No 740404.6), το οποίο περιέχει θειοκυανικό γουανιδίνιο και φαινόλη. Το θειοκυανικό γουανιδίνιο διαλύει τις

πρωτεΐνες και καταστρέφει τις δευτεροταγείς δομές τους, αδρανοποιώντας τες. Από την άλλη, η δομή των νουκλεϊκών οξέων δεν επηρεάζεται, ενώ προστατεύονται από τη δράση των νουκλεασών που καταστρέφονται από το θειοκυανικό γουανιδίνιο (Cox, 1968).

Η απομόνωση RNA έγινε από κύτταρα καλλιεργημένα σε τρυβλία Petri διαμέτρου 10 cm σε πυκνότητα περίπου 70%. Στο τρυβλίο προστίθενται 500 μl NucleoZOL και ακολουθεί απόξεση των κυττάρων από την επιφάνεια του τρυβλίου με ειδική ξύστρα. Το ελαιώδες κυττάρων μεταφέρεται σε δοχείο Eppendorf και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τη συλλογή υπολειμμάτων των κυττάρων. Στη συνέχεια, προστίθενται 200 μl αποστειρωμένο miliQ H₂O για κάθε 500 μl NucleoZOL, το μείγμα αναδεύεται έντονα για 15 sec και επωάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 13000 rpm για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη φυγοκέντρωση, το RNA βρίσκεται διαλυμένο στο υπερκείμενο, ενώ το DNA, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες στο ίζημα. Το υπερκείμενο που περιέχει το RNA μεταφέρεται σε νέο δοχείο Eppendorf, προστίθεται ίση ποσότητα ισοπροπανόλης και το διάλυμα επωάζεται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου, για να γίνει κατακρήμνιση του RNA. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 13000 rpm για 15 min και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Η πελλέτα, που περιέχει το RNA, πλένεται με 500 μl 75% EtOH, φυγοκεντρείται στα 13000 rpm για 5 min και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Η πλύση με 75% EtOH επαναλαμβάνεται και φυγοκεντρείται στα 13000 rpm για 10 min. Η πελλέτα του RNA διαλύεται σε 30 μl αποστειρωμένο miliQ H₂O, αναδεύεται με Vortex για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυλάσσεται στους -80 °C.

Το διάλυμα του RNA ελέγχθηκε ποιοτικά και ποσοτικά με το φασματοφωτόμετρο NanodropQ5000 και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1%. Τα δείγματα RNA που έχουν υψηλή καθαρότητα δίνουν χαρακτηριστικό πρότυπο ηλεκτροφόρησης με 2 ζώνες, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το ριβοσωμικό RNA της μικρής (18 S) και της μεγάλης (28 S) υπομονάδας.

Παρασκευή cDNA με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Μετά τον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο του απομονωμένου RNA, αυτό χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την παρασκευή cDNA με το εμπορικά διαθέσιμο kit PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara, Cat.No RR037Q). Η παρασκευή του cDNA γίνεται με τη χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης και DNA πολυμεράσης. Η αντίστροφη

μεταγραφάση είναι ένα ένζυμο που έχει απομονωθεί από ρετροϊούς, οι οποίοι χρησιμοποιούν το RNA σαν καλούπι για τη σύνθεση DNA. Με τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης δημιουργείται ένα υβρίδιο DNA-RNA. Για την παρασκευή του συμπληρωματικού κλώνου DNA χρησιμοποιείται η DNA πολυμεράση, η οποία χρησιμοποιεί σαν υπόστρωμα DNA και το επιμηκώνει από το 3' προς το 5' άκρο. Για να ξεκινήσει ο πολυμερισμός των κλώνων cDNA, τα ένζυμα αυτά χρειάζονται ένα δίκλωνο τμήμα εκκίνησης. Για το λόγο αυτό, στην αντίδραση προστίθεται μείγμα τυχαίων ολιγονουκλεοτιδίων που θα υβριδοποιηθούν στο ολικό RNA και στη συνέχεια στο cDNA που παράγεται από την αντίστροφη μεταγραφάση με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Επιπλέον, καθώς τα περισσότερα mRNAs περιέχουν πολυ-A ουρά, στο διάλυμα προστίθενται και εκκινητές πολύ-T, οι οποίοι υβριδοποιούνται στην πολύ-A ουρά των mRNAs.

Για την παρασκευή cDNA παρασκευάζεται διάλυμα τελικού όγκου 10 µl που περιέχει: 2 µl ρυθμιστικό διάλυμα 5x (PrimeScript™ Buffer for Real Time), το οποίο δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για τη δράση των ενζύμων, 0.5 µl μείγμα ενζύμων (PrimeScript™ RT Enzyme Mix I), που περιέχει αντίστροφη μεταγραφάση και DNA πολυμεράση, 0.5 µl εκκινητές πολύ-T 50 µM (Oligo dT Primer), 0.5 µl εκκινητές με τυχαία αλληλουχία 100 µM (Random 6mers), 500 ng ολικό RNA και αποστειρωμένο miliQ H₂O. Το διάλυμα επωάζεται στους 37 °C για 15 min για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση και στη συνέχεια θερμαίνεται στους 85 °C για 5 sec για να γίνει απενεργοποίηση των ενζύμων. Το διάλυμα cDNA αποθηκεύεται στους -20 °C.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) είναι μια μέθοδος που επινοήθηκε το 1983 από τον Kary Mullis και χρησιμοποιείται ευρέως στη μοριακή βιολογία για την ταχεία παραγωγή εκατομμυρίων έως δισεκατομμυρίων αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι επιτρέπει την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών (Saiki, et al., 1988).

Η τεχνική PCR μπορεί να ενισχύσει τμήματα DNA μεγέθους μεταξύ 0.1 έως και 10 kbp, ενώ με ειδικές προσαρμογές έχει επιτευχθεί ενίσχυση θραυσμάτων μεγέθους μέχρι 40 kbp (Cheng, et al., 1994).

Μια βασική αντίδραση PCR περιλαμβάνει τα εξής αντιδραστήρια:

- Ένα πρότυπο DNA, που περιέχει την περιοχή-στόχο προς ενίσχυση.
- DNA πολυμεράση: ένζυμο που συνθέτει νέα μόρια DNA. Στην PCR συνήθως χρησιμοποιείται Taq πολυμεράση, η οποία απομονώθηκε από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και χρησιμοποιείται για να αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες που εφαρμόζονται για την αποδιάταξη των μορίων DNA (Lawyer, et al., 1993).
- Ένα ζεύγος εκκινητών: κάθε εκκινητής πρέπει να είναι συμπληρωματικός προς το 3' άκρο του κωδικού και του μη κωδικού κλώνου του DNA στόχου. Οι εκκινητές είναι απαραίτητοι, διότι η DNA πολυμεράση απαιτεί την ύπαρξη ενός δίκλωνου τμήματος για να ξεκινήσει την επιμήκυνση του DNA.
- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs): τα νουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται από την DNA πολυμεράση για τη σύνθεση των νέων κλώνων DNA.
- Ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο παρέχει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για βέλτιστη δραστηριότητα και σταθερότητα της DNA πολυμεράσης.
- Δισθενή κατιόντα: συνήθως χρησιμοποιούνται ιόντα μαγνησίου (Mg^{+2}) ή μαγγανίου (Mn^{+2}).

Η PCR αποτελείται από μια σειρά 20-40 επαναλαμβανόμενων θερμικών κύκλων, δηλαδή επαναλαμβανόμενων αλλαγών θερμοκρασίας. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία διακριτά στάδια θερμοκρασίας: το στάδιο αποδιάταξης των μορίων DNA, που γίνεται σε θερμοκρασία $> 90^{\circ}C$, το στάδιο υβριδοποίησης των εκκινητών, που γίνεται σε θερμοκρασία $50-65^{\circ}C$ (θερμοκρασία κατάλληλη ώστε να επιτρέπεται η υβριδοποίηση των εκκινητών μόνο στην περιοχή του DNA που είναι συμπληρωματική) και το στάδιο πολυμερισμού των μορίων DNA, που γίνεται στους $72^{\circ}C$, όπου δρα βέλτιστα η Taq πολυμεράση. Πριν την έναρξη των κύκλων αντίδρασης, συνήθως προηγείται ένα στάδιο υψηλής θερμοκρασίας ($> 90^{\circ}C$), για να αποδιαταχθούν πλήρως τα μόρια DNA που υπάρχουν στο διάλυμα, ενώ μετά την ολοκλήρωση των θερμικών κύκλων ακολουθεί ένα στάδιο διάρκειας 10 min για την ολοκλήρωση της επιμήκυνσης των μορίων DNA και ψύξη στους $4^{\circ}C$. Οι θερμοκρασίες και η χρονική διάρκεια των επιμέρους σταδίων και ο αριθμός των κύκλων που εφαρμόζονται εξαρτώνται από το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του DNA, την αρχική συγκέντρωση της αλληλουχίας-στόχο στο διάλυμα, τη συγκέντρωση δισθενών ιόντων και dNTPs στην αντίδραση και τη θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών (Rychlik, et al., 1990). Ο

τελικός αριθμός των μορίων που παράγονται είναι 2^n , όπου n ο αριθμός των θερμικών κύκλων που πραγματοποιήθηκαν.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην PCR πρέπει να πληρούν τις εξής προϋποθέσεις:

- Να αποτελούνται από τουλάχιστον 18 νουκλεοτίδια, ώστε να μειωθεί η πιθανότητα μη ειδικής πρόσδεσης. Συνήθως χρησιμοποιούνται εκκινητές μήκους 18-25 bp.
- Το ποσοστό περιεκτικότητας σε C+G να είναι 35-65% και η αλληλουχία να είναι τέτοια, ώστε να αποφεύγεται η πιθανότητα δημιουργίας φουρκετών, γιατί αυτό μπορεί να παρεμποδίσει την πρόσδεση του εκκινητή στην αλληλουχία-στόχο.
- Οι εκκινητές δεν πρέπει να φέρουν συμπληρωματικές αλληλουχίες, ώστε να μη δημιουργούν διμερή μεταξύ τους.
- Τα σημεία τήξης των εκκινητών πρέπει να διαφέρουν λιγότερο από 2 °C.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 25 μ l με την εξής σύσταση: 2.5 μ l ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) 10x, 1.5 μ l $MgCl_2$ 50mM, 1 μ l dNTPs 50mM, 0.5 μ l πρόσθιου εκκινητή (Forward Primer) 10 pmol / μ l, 0.5 μ l ανάστροφου εκκινητή (Reverse Primer) 10 pmol / μ l, 0.5 μ l Taq πολυμεράση 5 U / μ l, 0.5 μ g cDNA ή 100 ng γονιδιωματικό DNA και αποστειρωμένο miliQ H_2O . Μετά την ολοκλήρωση της PCR, οι αντιδράσεις ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης για τον έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων. Ως αρνητικός έλεγχος χρησιμοποιείται μια αντίδραση που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από DNA.

Η PCR χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της μόλυνσης των κυττάρων *HeLa* από μυκόπλασμα, για τον έλεγχο της ακεραιότητας του γονιδιώματος και για τον έλεγχο της έκφρασης του διαγονιδίου *FRA10AC1*. Ο έλεγχος της ύπαρξης μυκοπλάσματος στην κυτταροκαλλιέργεια είναι πολύ σημαντικός, καθώς η μόλυνση αυτή οδηγεί σε διαφοροποίηση της φυσιολογίας και του μεταβολισμού των κυττάρων (Nikfarjam & Farzaneh, 2012). Για την ανίχνευση του μυκοπλάσματος χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές MGSO και GPO-3, που υβριδοποιούνται στο γονιδίωμα του βακτηρίου και παράγουν προϊόν μήκους 280 bp. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε 100 ng γονιδιωματικό DNA από κάθε κλώνο που ελέγχθηκε και ως θετικός έλεγχος γονιδιωματικό DNA από κυτταρική σειρά μολυσμένη από μυκόπλασμα. Για τον έλεγχο της ακεραιότητας του διαγονιδίου στο γονιδίωμα των κλώνων χρησιμοποιήθηκαν τα

ζεύγη εκκινητών: F-Xpress / R-Xpress, F-Xpress / R1, F1 / R1, F2 / R2, F1 / R2 και ως υπόστρωμα 100 ng γονιδιωματικό DNA από κάθε κλώνο. Για τον έλεγχο της έκφρασης του διαγονιδίου χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών F-Xpress / F1 και F2 / R2. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε 1 μl από το διάλυμα παρασκευής cDNA. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν PCR χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα 0.1 ng πλασμιδιακό DNA. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR.

Πίνακας 3: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Tm
F1	5'-TTGGATTTAGGTGGCGAGTAGAAA-3'	57.5 °C
R1	5'-ACTTCCCAACTCTTTAAGCCTTCT-3'	57.3 °C
F2	5'-TGCAGAAGAGGCCTCCAAGA-3'	59.4 °C
R2	5'-GGTAGTGGACCCTTCCAAAGTTC-3'	62.4 °C
F-Xpress	5'-GATCTGTACGACGATGACGATAAG-3'	63.4 °C
R3	5'-TGGAGCAGTAAGTCATCTTCAACT-3'	64.7 °C
MGSO	5'-CCRTGCACCA YCTGTCWHHHB GWWAACCTC-3'	55°C
GPO-3	5'-GAAAGYGTGGGGAGCAAAYAGGATTAGATACCC T-3'	55°C

Y:C ή T, W:A ή T, H:A ή C ή T

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις είναι:

1. Θέρμανση στους 95 °C για 3 min (αρχική αποδιάταξη των μορίων DNA).
2. Θέρμανση στους 95 °C για 45 sec (αποδιάταξη των μορίων DNA).
3. Θέρμανση στους 55-63 °C¹ για 30 sec (υβριδοποίηση των εκκινητών).
4. Θέρμανση στους 72 °C για 45 sec (πολυμερισμός των νέων κλώνων).
5. Επανάληψη από το βήμα 2 για 25-40 κύκλους².
6. Θέρμανση στους 72 °C για 10 min (επιμήκυνση των τμημάτων DNA).
7. Ψύξη στους 4 °C (προσωρινή αποθήκευση για το διάστημα που τα δείγματα διατηρούνται στο μηχάνημα).

¹ Η θερμοκρασία επιλέγεται ανάλογα με τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών.

² Για ημιποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης ενός γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν 25 κύκλοι αντίδρασης. Σε αντιδράσεις με υπόστρωμα γονιδιωματικό DNA χρησιμοποιήθηκαν 40 κύκλοι αντίδρασης.

Ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός είναι μια τεχνική που βασίζεται στην εξειδικευμένη πρόσδεση των αντισωμάτων στο αντιγόνο. Μέσω του ανοσοφθορισμού στοχεύονται φθορίζουσες χρωστικές σε συγκεκριμένους στόχους-βιομόρια εντός του κυττάρου, επιτρέποντας την οπτικοποίηση της κατανομής του μορίου-στόχου μέσα στο δείγμα. Ο ανοσοφθορισμός χρησιμοποιήθηκε για να παρατηρηθεί το επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης FRA10AC1 στα διαμολυσμένα κύτταρα *HeLa*, σε σύγκριση με κύτταρα *HeLa* αγρίου τύπου και κύτταρα *HeLa* διαμολυσμένα με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1/His B, που δε φέρει το διαγονίδιο *FRA10AC1*. Για τον ανοσοεντοπισμό της πρωτεΐνης FRA10AC1 χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα anti-FRA10AC1, που αναγνωρίζει επίτοπο στην πρωτεΐνη FRA10AC1. Το πρωτογενές αντίσωμα anti-FRA10AC1 έχει παραχθεί σε κουνέλι από την ομάδα του εργαστηρίου μας και για τον εντοπισμό του χρησιμοποιείται το δευτερογενές αντίσωμα «Alexa Fluor 568 Goat Anti-Rabbit» (Molecular Probes, Cat.No A-11036). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική DAPI, η οποία προσδένεται στο DNA σε περιοχές πλούσιες σε αδενίνη και θυμίνη, βάφοντας τον πυρήνα των κυττάρων όπου υπάρχει DNA.

Για τον ανοσοεντοπισμό της πρωτεΐνης FRA10AC1, χρησιμοποιούνται καλυπτρίδες διαμέτρου 12 mm, επιστρωμένες με περίπου 10^5 κύτταρα από κάθε κυτταρικό κλώνο. Για χρήση ως αρνητικοί έλεγχοι της ειδικότητας των αντισωμάτων επιστρώνονται δύο καλυπτρίδες με κύτταρα που είναι γνωστό ότι εκφράζουν τον επίτοπο που αναγνωρίζει το αντίσωμα. Στις καλυπτρίδες γίνονται τρεις πλύσεις διάρκειας 5 min με κρύο (4 °C) PBS 1x. Έπειτα, τα κύτταρα επωάζονται με διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδη (PFA) για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και ξεπλένονται (τρεις πλύσεις διάρκειας 5 min με κρύο PBS 1x). Η παραφορμαλδεΐδη δημιουργεί ομοιοπολικούς δεσμούς ανάμεσα στα μόρια του κυττάρου, δημιουργώντας ένα αδιάλυτο πλέγμα. Οι καλυπτρίδες επωάζονται με 0.3% Triton-X, το οποίο είναι απορρυπαντικό και δημιουργεί πόρους στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων, ώστε να μπορέσουν τα αντισώματα να τη διαπεράσουν. Τα κύτταρα πλένονται (τρεις πλύσεις με κρύο PBS 1x διάρκειας 5 min) και στη συνέχεια επωάζονται με διάλυμα δέσμησης μη ειδικών θέσεων (blocking) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αυτό αποτελείται από 3% BSA, 10% FBS και 87% PBS 1x. Το BSA και το FBS είναι διαλύματα με υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών, οι οποίες καλύπτουν τους επιτόπους του κυττάρου, μειώνοντας την πιθανότητα προσκόλλησης των αντισωμάτων σε μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης. Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες επωάζονται στους 4 °C ολονύκτια, σε συνθήκες υγρασίας, με

το πρωτογενές αντίσωμα anti-FRA10AC1, το οποίο έχει αραιωθεί σε διάλυμα blocking σε αραιώση 1:250.

Την επόμενη ημέρα οι καλυπτρίδες πλένονται τρεις φορές επί 5 min με διάλυμα 0.1% Tween-PBS 1x. Το Tween συμβάλει στη μείωση της μη ειδικής δέσμευσης, απομακρύνοντας το πλεονάζων αντίσωμα, ενώ συμβάλλει και στην ομοιόμορφη κατανομή των αντισωμάτων στην καλυπτρίδα. Μετά τις πλύσεις, οι καλυπτρίδες επωάζονται με το δευτερογενές αντίσωμα Anti-Rabbit, αραιωμένο σε διάλυμα blocking σε συγκέντρωση 1:250. Η επώαση γίνεται σε σκιερό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου και διαρκεί 30 min. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι φωτοευαίσθητο, για αυτό από το σημείο αυτό και έπειτα όλες οι διεργασίες γίνονται εκθέτοντας τις καλυπτρίδες σε φως για όσο το δυνατόν μικρότερο χρονικό διάστημα. Οι καλυπτρίδες πλένονται με διάλυμα 0.1% Tween-PBS 1x (τρεις πλύσεις διάρκειας 5 min) και επωάζονται με 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) σε συγκέντρωση 1 μg / ml σε μεθανόλη για 1 min. Ακολουθούν τρεις πλύσεις με 0,1% Tween-PBS 1x διάρκειας 5 min, ταχεία πλύση με ddH₂O και στέγνωμα με απορροφητικό χαρτί. Οι καλυπτρίδες επιστρώνονται σε αντικειμενοφόρους με τη χρήση mowiol ($\approx 40 \mu\text{l}$ / καλυπτρίδα), το οποίο σκληραίνει με την πάροδο του χρόνου, βοηθώντας στην προσκόλληση και στεγανοποίηση του δείγματος.

Απομόνωση εκχυλίσματος πρωτεϊνών από κύτταρα *HeLa*

Για την απομόνωση εκχυλίσματος πρωτεϊνών από τους κυτταρικούς κλώνους χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer), που περιλαμβάνει 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5% Sodium deoxycholate (DOC), 0.1% SDS, 1 mM EDTA και 0.1% Triton-X. Το Triton-X είναι απορρυπαντικό το οποίο χρησιμοποιείται για τη δημιουργία πόρων στην κυτταρική μεμβράνη, ώστε να επιτευχθεί η απομόνωση των πρωτεϊνών. Το Tris-HCl χρησιμοποιείται ως ρυθμιστικό διάλυμα για να διατηρείται σταθερό το pH του εκχυλίσματος πρωτεϊνών, το EDTA είναι χηλικός παράγοντας δισθενών ιόντων και αποτρέπει την πέψη των πρωτεϊνών από πρωτεάσες και το Sodium deoxycholate καταστρέφει τις αλληλεπιδράσεις που εμπλέκονται στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών, που περιλαμβάνουν δισουλφιδικούς δεσμούς, δεσμούς υδρογόνου, δυνάμεις van der Waals, ιοντικές αλληλεπιδράσεις και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Αρχικά γίνεται συλλογή πελλέτας κυττάρων από 2 τρυβλία Petri περιεκτικότητας περίπου 70%. Η συλλογή γίνεται μετά από αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου από το τρυβλίο, πλύση με PBS 1x και ακολουθεί απόξεση με PBS 1x και τη χρήση ειδικής ξύστρας. Το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται στα 1000 rpm για 1 min, απορρίπτεται το υπερκείμενο, γίνεται προσθήκη 40 µl διαλύματος RIPA, αναδεύεται με vortex για 1 min και επώαζεται στον πάγο για 10 min. Ακολουθεί ανάδευση με vortex για 1 min, επώαση στον πάγο για 10 min και ξανά ανάδευση με vortex για 1 min. Το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται στα 12.000 rpm για 30 min στους 4 °C, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο δοχείο Eppendorf και φυλάσσεται στους -80 °C.

Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική Bradford. Το διάλυμα Bradford παρασκευάζεται με 0.1 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 47 ml 100% Methanol, 100 ml 85% Phosphoric acid και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 200 ml. Το Coomassie Brilliant Blue αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά αλλά μη ομοιοπολικά με τις αμινο- και καρβοξυλ-ομάδες των πρωτεϊνών, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής. Ο σχηματισμός του συμπλέγματος σταθεροποιεί την αρνητικά φορτισμένη ανιονική μορφή της χρωστικής που παράγει το μπλε χρώμα. Η δέσμευση της χρωστικής σε μια πρωτεΐνη προκαλεί μετατόπιση του μεγίστου της απορρόφησης της χρωστικής από 465 σε 595 nm. Η αύξηση της απορρόφησης στα 595 nm χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Για την εφαρμογή της τεχνικής αρχικά σχεδιάζεται πρότυπη καμπύλη μετρώντας την οπτική απορρόφηση διαλύματα γνωστής αυξανόμενης συγκέντρωσης πρωτεϊνών στα 595 nm. Στον Πίνακα 4 αναγράφεται η σύσταση των διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης.

Ποσότητα 3 µl εκχυλίσματος πρωτεϊνών αραιώνεται σε 3 ml Bradford και 97 µl ddH₂O και μετράται η οπτική απορρόφησή του στα 595 nm. Έπειτα, βάσει της πρότυπης καμπύλης, υπολογίζεται η συγκέντρωση πρωτεϊνών στο εκχύλισμα. Αν το εκχύλισμα έχει υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών και η οπτική απορρόφηση που λαμβάνεται είναι εκτός των ορίων της πρότυπης καμπύλης, γίνεται αρραίωση του δείγματος και επανάληψη της φωτομέτρησης.

Πίνακας 4: Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης.

Διάλυμα	Bradford	BSA 600 $\mu\text{g} / \text{ml}$	ddH ₂ O
1	3 ml	20 μl (12 μg)	80 μl
2	3 ml	40 μl (24 μg)	60 μl
3	3 ml	60 μl (36 μg)	40 μl
4	3 ml	80 μl (48 μg)	20 μl
5	3 ml	100 μl (60 μg)	-

Ανοσοαποτύπωση Western (Western blotting)

Η ανοσοαποτύπωση Western χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση της έκφρασης πρωτεϊνών στα κύτταρα. Για την εφαρμογή της τεχνικής αρχικά γίνεται ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, στη συνέχεια ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη φθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF) και εντοπισμός της πρωτεΐνης με τη χρήση αντισωμάτων. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης Western.

Διάλυμα	Σύσταση
Upper buffer	0.5 M Tris, 0.4% SDS, HCl για τη ρύθμιση του pH στο 6.8 και ddH ₂ O μέχρι τελικό όγκο 50 ml
Lower buffer	1.5 M Tris, 0.4% SDS, HCl για τη ρύθμιση του pH στο 8.8 και ddH ₂ O μέχρι τελικό όγκο 50 ml
30% Mix acrylamide	29 g acrylamide, 1 g N-N'methylenbis acrylamide και ddH ₂ O μέχρι τελικό όγκο 100 ml
20% APS	0.2 g APS και ddH ₂ O μέχρι τελικό όγκο 1 ml
Laemmli buffer 10x (η αραιώση σε 1x γίνεται με ddH ₂ O)	31 g Tris, 144 g glycine, 10 g SDS, HCl για τη ρύθμιση του pH στο 8.3 και ddH ₂ O μέχρι τελικό όγκο 1 L

Laemmli	250 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 0.5% bromophenol blue, 50% glycerol, 25% mercaptoethanol, ddH ₂ O μέχρι τελικό όγκο 2 ml
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς 10x (η αραιώση σε 1x γίνεται με 800 ml ddH ₂ O και 100 ml methanol)	30 g Tris, 150 g glycine και ddH ₂ O μέχρι τελικό όγκο 1 L
Χρώση Coomassie	22.5 ml methanol, 5 ml acetic acid, 0.125 g Coomassie Brilliant Blue R250, 22,5 ml ddH ₂ O
Χρώση Ponceau	0.1% w / v ponceau, 5% v/v acetic acid, ddH ₂ O
Διάλυμα αποχρωματισμού	150 ml methanol, 50 ml acetic acid, 300 ml ddH ₂ O
TBS 10x	Tris 0,5 M, NaCl 1,5 M, HCl για τη ρύθμιση του pH στο 7.6 και ddH ₂ O μέχρι τελικό όγκο 1 L
TBS / T	TBS 10x 10%, 0.5% Tween 20 και ddH ₂ O μέχρι τελικό όγκο 1 L
Blocking	1 g σκόνη γάλατος σε 20 ml TBS / T
Διάλυμα αραιώσης αντισωμάτων	0.5 g σκόνη γάλατος σε 20 ml TBS / T
Stripping buffer	15 g glycine, 1g SDS, 10 ml Tween, HCl για τη ρύθμιση του pH στο 2.2 και ddH ₂ O μέχρι τελικό όγκο 1 L

Το πήκτωμα παρασκευάζεται από δύο διαλύματα, με διαφορετική οξύτητα και συγκέντρωση ακρυλαμίδης. Το διάλυμα επιστοιβαξης παρασκευάζεται με 1 ml Upper buffer, 600 μl 30% μείγμα ακρυλαμίδης (Mix acrylamide), 2.4 ml ddH₂O, 30 μl 20% Ammonium persulfate (APS) και 5 μl TEMED. Το διάλυμα αυτό έχει χαμηλή συγκέντρωση ακρυλαμίδης (4.55%), χαμηλή συγκέντρωση αλάτων και χαμηλό pH (6.8), συνθήκες που βοηθούν τις πρωτεΐνες να επιστοιβαχτούν, ώστε να εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτική διαχωρισμού και έτσι η απόσταση που διανύουν κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης να είναι ανάλογη του μεγέθους τους. Η πηκτική

διαχωρισμού παρασκευάζεται με 1.25 ml Lower buffer, 2.65 ml 30% Mix acrylamide, 1.53 ml ddH₂O, 50 μl 20% APS και 5 μl TEMED. Το πήκτωμα διαχωρισμού έχει υψηλότερη συγκέντρωση ακρυλαμίδης (8%) και pH 8.8, επιτρέποντας στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών κατά την ηλεκτροφόρηση.

Αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα διαχωρισμού, το οποίο τοποθετείται ανάμεσα σε δύο γυάλινες πλάκες και προστίθεται μικρή ποσότητα ddH₂O, ώστε να μην αφυδατωθεί η επιφάνεια της πηκτής που έρχεται σε επαφή με τον αέρα. Μετά την πήξη του πηκτώματος διαχωρισμού αφαιρείται το νερό, παρασκευάζεται και τοποθετείται το πήκτωμα επιστοιβάξης. Αμέσως μετά γίνεται τοποθέτηση χτενιού πλάτους 0.75 mm για το σχηματισμό των φρεατίων τοποθέτησης του εκχυλίσματος πρωτεϊνών και το πήκτωμα αφήνεται μέχρι να σταθεροποιηθεί. Μετά τη σταθεροποίηση του πηκτώματος προστίθεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli buffer.

Σε 150 μg εκχυλίσματος πρωτεϊνών προστίθεται διάλυμα Laemmli σε ποσότητα 1 / 5 του τελικού όγκου και το δείγμα θερμαίνεται στους 95 °C για 5 min για να γίνει μετουσίωση των πρωτεϊνών και απενεργοποίηση των πρωτεασών, προστατεύοντας τις πρωτεΐνες του δείγματος. Το διάλυμα Laemmli περιέχει Tris-HCl για τη διατήρηση του pH του εκχυλίσματος και SDS και β-μερκαπροαιθανόλη που είναι ισχυρά αναγωγικοί παράγοντες και διατηρούν τις πρωτεΐνες σε αποδιατεταγμένη μορφή. Επιπλέον, το SDS προσδίδει στις πρωτεΐνες αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα να φέρουν όλες το ίδιο φορτίο και η ταχύτητα μετακίνησής τους στο πήκτωμα να εξαρτάται μόνο από το μέγεθός τους. Το μπλε της βρωμοφαινόλης επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας των πρωτεϊνών κατά την ηλεκτροφόρηση. Η γλυκερόλη αυξάνει το ιξώδες του διαλύματος, κάνοντας το δείγμα να εμβυθίζεται στον πάτο του φρεατίου. Μετά το βρασμό τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για λίγα λεπτά για να μειωθεί η θερμοκρασία τους και φορτώνονται στα φρεάτια. Επιπλέον, τοποθετείται μάρτυρας μοριακών μεγεθών που αποτελεί μείγμα πρωτεϊνών με γνωστά μοριακά μεγέθη, ώστε να μπορεί να ταυτοποιηθεί το μέγεθος των πρωτεϊνών που έχει αναγνωριστεί από το αντίσωμα. Στην ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών Prestained Protein Marker BlueStar (Cat.No MWP03). Μετά το φόρτωμα των δειγμάτων η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με πηγή που ρυθμίζεται να εφαρμόζει τάση 90 V, ώστε να γίνει ηλεκτροφόρηση και διαχωρισμός των πρωτεϊνών βάσει του μοριακού μεγέθους.

Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών το πήκτωμα που περιέχει τις πρωτεΐνες τοποθετείται σε συσκευή «sandwich» μαζί με μεμβράνη Porablot PVDF

(Cat.No 010398), ανάμεσα σε σφουγγάρια για να έρθουν σε στενή επαφή. Η συσκευή «sandwich» τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και εφαρμόζεται τάση, ώστε οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες που βρίσκονται στο πήκτωμα να μεταφερθούν στη μεμβράνη. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιείται με τάση 42 V για 18 ώρες στους 4 °C.

Μετά την ηλεκτρομεταφορά γίνεται χρώση του πηκτώματος με χρωστική Coomassie, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι έχουν μεταφερθεί η πρωτεΐνες στη μεμβράνη. Για την παρασκευή της χρώσης προστίθεται χρωστική Coomassie στο πήκτωμα, το οποίο επώάζεται για 30 min υπό ανάδευση. Έπειτα, η χρωστική αφαιρείται, το πήκτωμα ξεπλένεται με νερό και επώάζεται υπό ανάδευση με διάλυμα αποχρωματισμού μέχρι το πήκτωμα να γίνει ξανά διαφανές. Σε περίπτωση ανάγκης επιβεβαίωσης της επιτυχούς μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη γίνεται χρώση με χρωστική Ponceau S με επώαση διάρκειας 30 min υπό ανάδευση. Η Ponceau S είναι μια αρνητικά φορτισμένη, κόκκινη χρωστική που συνδέεται με θετικά φορτισμένες αμινομάδες και μη πολικές περιοχές πρωτεϊνών. Στη συνέχεια πραγματοποιείται πλύση με νερό και έπειτα επώαση υπό ανάδευση με διάλυμα αποχρωματισμού μέχρι να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα χρωστικής που δεν έχει δεσμευτεί σε πρωτεΐνες. Επειδή η χρώση των πρωτεϊνών με Ponceau S μπορεί να επηρεάσει την απόδοση της ανοσοαποτύπωσης συνήθως γίνεται μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας.

Η μεμβράνη, μετά την ηλεκτρομεταφορά, πλένεται τρεις φορές επί 5 min υπό ανάδευση με διάλυμα Tris-buffered saline (TBS). Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με διάλυμα δέσμησης μη ειδικών θέσεων (blocking) για 3 hours υπό ανάδευση και εις τριπλούν πλύση της μεμβράνης διάρκειας 5 min καθεμία υπό ανάδευση με διάλυμα Tris-buffered saline / Tween (TBS / T). Το Tween είναι απορρυπαντικό και προστίθεται στο διάλυμα πλύσης για να αφαιρεθεί το επιπλέον διάλυμα δέσμησης μη ειδικών θέσεων. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση με το πρώτο αντίσωμα, που αναγνωρίζει ειδικά την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, ολονύκτια στους 4 °C. Ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα: anti-FRA10AC1 σε συγκέντρωση 1:200 και anti- β -tubulin σε συγκέντρωση 1:3000. Έπειτα, ακολουθούν ξανά τρεις πλύσεις υπό ανάδευση διάρκειας 5 min με διάλυμα TBS / T για την αφαίρεση των αντισωμάτων που δεν έχουν προσδεθεί σε πρωτεΐνες και επώαση της μεμβράνης με δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με Horseradish Peroxidase (HRP) σε συγκέντρωση 1:3000 για 2 hours υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Για τον εντοπισμό του αντισώματος anti-FRA10AC1 χρησιμοποιήθηκε δευτερογενές

αντίσωμα anti-rabbit-HRP, ενώ για τον εντοπισμό του αντισώματος anti-b-tubulin χρησιμοποιήθηκε δευτερογενές αντίσωμα anti-mouse-HRP. Η μεμβράνη πλένεται ξανά τρεις φορές επί 5 min υπό ανάδευση με διάλυμα TBS / T για την αφαίρεση του πλεονάζοντος αντισώματος.

Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται χημειοφωταύγεια και η διαδικασία πραγματοποιείται σε ειδικά διαμορφωμένο σκοτεινό δωμάτιο. Η μεμβράνη επώάζεται με ECL που περιέχει λουμινόλη για 5 min, η οποία διασπάται από το HRP που είναι συνδεδεμένο στο δευτερογενές αντίσωμα, παράγοντας χημειοφωταύγεια. Επομένως, η παραγωγή φωταύγειας είναι ανάλογη με την ποσότητα του συζευγμένου με HRP δευτερογενούς αντισώματος, και συνεπώς, μετρά έμμεσα την παρουσία της πρωτεΐνης στόχου. Ένα ευαίσθητο στο φως φωτογραφικό φιλμ Fuji X-ray Films RX μεγέθους 13 cm x 18 cm (Cat.No RX1318) τοποθετείται για τουλάχιστον 2 min πάνω στη μεμβράνη μέσα σε ειδική κασετίνα που επιτρέπει τη στενή επαφή της μεμβράνης με το φιλμ και η έκθεση στο φως που παράγεται από την αντίδραση δημιουργεί μια εικόνα των αντισωμάτων που βρίσκονται στη μεμβράνη. Το φιλμ πλένεται με νερό και εμβυθίζεται σε διάλυμα ανάπτυξης (Cat.No DEV0103), πλένεται με νερό, βυθίζεται σε διάλυμα σταθεροποιητή (Cat.No DEV0103) και πλένεται ξανά. Το διάλυμα ανάπτυξης μετατρέπει τη λανθάνουσα εικόνα που έχει δημιουργηθεί από την έκθεση του φιλμ σε ορατή. Ο σκοπός του σταθεροποιητή είναι να απομακρύνει τους κρυστάλλους αλογονιδίου αργύρου που δεν έχουν εκτεθεί και δεν έχουν ενεργοποιηθεί από το φωτισμό της μεμβράνης. Ο σταθεροποιητής προκαλεί επίσης σκλήρυνση του φιλμ.

Η ίδια μεμβράνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επώαση με άλλο πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται διάλυμα Stripping στο οποίο επώάζεται η μεμβράνη για 10 min υπό ανάδευση, ακολουθεί πλύση διάρκειας 10 min με PBS 1x υπό ανάδευση, επώαση με διάλυμα Stripping για 10 min υπό ανάδευση, δύο πλύσεις με PBS 1x διάρκειας 10 min υπό ανάδευση και δύο πλύσεις διάρκειας 5 min υπό ανάδευση με TBS / T. Στη συνέχεια γίνεται επώαση της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα και ακολουθείται η διαδικασία όπως περιεγράφηκε παραπάνω.

Εργαλεία βιοπληροφορικής

Βάσεις δεδομένων

Η βάση δεδομένων UniProt (<https://www.uniprot.org/>)



Η βάση δεδομένων UniProt αποτελεί μια πηγή δεδομένων για πρωτεΐνες, η οποία περιλαμβάνει την αλληλουχία και λεπτομερή παράθεση γνώσεων σχετικά με αυτές. Η UniProt είναι αποτέλεσμα συνεργασίας

μεταξύ του Ευρωπαϊκού Ινστιτούτου Βιοπληροφορικής (EMBL-EBI), του SIB Swiss Institute of Bioinformatics και του Protein Information Resource (PIR). Η βάση δεδομένων περιέχει πάνω από 60 εκατομμύρια αλληλουχίες, και δεδομένα για το πρωτέωμα 5631 ειδών. Επιπλέον, δίνει τη δυνατότητα αντιστοίχισης των αναγνωριστικών κωδικών με άλλες βάσεις δεδομένων, διευκολύνοντας την αναζήτηση πληροφοριών.

Η μετα-βάση δεδομένων PICKLE (www.pickle.gr)



Για την κατασκευή του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 στον άνθρωπο χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα

πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων από τη μετα-βάση δεδομένων PICKLE. Η μετα-βάση δεδομένων PICKLE (Protein Interaction KnowLedgebasE) δημιουργήθηκε με στόχο να ανακατασκευαστεί το τρέχον πειραματικά υποστηριζόμενο δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του ανθρώπου (Klapa, et al., 2013). Στη μετα-βάση αυτή παρουσιάζονται οι άμεσες φυσικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, επιλέγοντας από τη βιβλιογραφία τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις για τις οποίες υπάρχει τουλάχιστον ένα πείραμα ικανό να υποδηλώνει άμεση αλληλεπίδραση. Επιπλέον, στην PICKLE 2.0 (Gioutlakis, et al., 2017) έχει γίνει ανακατασκευή του δικτύου οντολογιών γενετικών πληροφοριών, παρέχοντας δεδομένα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σε διαφορετικά επίπεδα γενετικής αναφοράς (γονίδιο και πρωτεΐνη), επιτρέποντας τη διασταύρωση των πρωτογενών δεδομένων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Τέλος, δίνει τη δυνατότητα παρουσίασης του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σε τρία επίπεδα αξιοπιστίας, βάσει της πειραματικής διαδικασίας που προσδιόρισε τις αλληλεπιδράσεις. Στο δίκτυο με βαθμό εμπιστοσύνης 1 (PPI Quality 1)

παρουσιάζονται πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις υψηλής αξιοπιστίας, δηλαδή που έχουν ταυτοποιηθεί με πειράματα που αποδεικνύουν άμεση αλληλεπίδραση, όπως το σύστημα δύο υβριδίων. Στο δίκτυο με βαθμό εμπιστοσύνης 2 παρουσιάζονται αλληλεπιδράσεις που έχουν ταυτοποιηθεί με μεθόδους που δε θεωρούνται υψηλής αξιοπιστίας, ενώ στο χαμηλότερο επίπεδο με βαθμό εμπιστοσύνης 3 παρουσιάζονται μη φιλτραρισμένα δεδομένα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, όπως είναι αυτά που προέρχονται από πειράματα μεγάλης κλίμακας. Οι αλληλεπιδράσεις αντλούνται από τις βάσεις πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του ανθρώπου IntAct, BioGRID, HPRD, MINT και DIP. Επιπλέον, μπορεί να γίνει ταυτόχρονη αναζήτηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων περισσότερων από ενός μορίων.

Η βάση δεδομένων BioGRID (<https://thebiogrid.org/>)



Για την αναζήτηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων ορθόλογων πρωτεϊνών της FRA10AC1 χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων BioGRID. Η BioGRID είναι μια ελεύθερα προσβάσιμη βάση δεδομένων που

περιλαμβάνει γενετικά και πρωτεϊνικά δεδομένα αλληλεπιδράσεων στον άνθρωπο και σε διάφορους οργανισμούς μοντέλα. Η BioGRID διαθέτει περισσότερες από 1.740.000 αλληλεπιδράσεις που προέρχονται τόσο από δεδομένα πειραμάτων υψηλής απόδοσης όσο και από μεμονωμένες εστιασμένες μελέτες, καθώς και περισσότερες από 70.000 δημοσιεύσεις στην πρωτογενή βιβλιογραφία (Stark, et al., 2006).

Η βάση δεδομένων IntAct (<https://www.ebi.ac.uk/intact/>)



Η IntAct αποτελεί μια βάση δεδομένων ανοιχτού κώδικα και μια εργαλειοθήκη για την αποθήκευση, παρουσίαση και ανάλυση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σε διάφορους οργανισμούς. Η βάση παρέχει τη δυνατότητα γραφικής αναπαράστασης των πρωτεϊνικών

αλληλεπιδράσεων και την εξερεύνηση του δικτύου δίνοντας στοιχεία για την οντολογία κάθε πρωτεΐνης. Τα δεδομένα της βάσης προέρχονται είτε από επιστημονικές

δημοσιεύσεις είτε από χειρωνακτική καταχώρηση, μετά από επιμέλεια ειδικού εμπειρογνώμονα επιστήμονα (Hermjakob, et al., 2004). Σήμερα αποτελεί μέρος της Κοινοπραξίας Ευρωπαϊκής Ερευνητικής Υποδομής Elixir.

Η βάση δεδομένων Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)



Η βάση δεδομένων Entrez Gene είναι μια βάση δεδομένων του National Center for Biotechnology Information (NCBI) που περιλαμβάνει πληροφορίες για γονίδια. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει πληροφορίες για γονιδιώματα στα οποία έχει γίνει πλήρης αλληλούχηση, οι οποίες προέρχονται από το Reference Sequence του NCBI (RefSeq), συνεργαζόμενες βάσεις δεδομένων για διάφορα είδη, κοινοπραξίες όπως το Gene Ontology και άλλες βάσεις δεδομένων στο NCBI (Maglott, et al., 2011).

Η βάση δεδομένων FlyBase (<https://flybase.org/>)



Η βάση δεδομένων FlyBase είναι μια διαδικτυακή βάση δεδομένων βιοπληροφορικής και το κύριο αποθετήριο γενετικών και μοριακών δεδομένων για την οικογένεια εντόμων *Drosophilidae*

(Thurmond, et al., 2019). Οι πληροφορίες στη βάση FlyBase προέρχονται από μια ποικιλία πηγών που περιλαμβάνει μεγάλης κλίμακας αναλύσεις γονιδιώματος και πρωτογενή ερευνητική βιβλιογραφία. Τα δεδομένα που υπάρχουν στη βάση περιλαμβάνουν μεταλλαγμένους φαινοτύπους, μοριακό χαρακτηρισμό μεταλλαγμένων αλληλίων και άλλων πολυμορφισμών, κυτταρολογικούς χάρτες, προφίλ έκφρασης σε άτομα αγρίου τύπου, ανατομικές εικόνες, διαγονιδιακές κατασκευές, μοντέλα γονιδίων σε επίπεδο αλληλουχίας και μοριακή ταξινόμηση των λειτουργιών των γονιδιακών προϊόντων (Crosby, et al., 2007). Η πλοήγηση στη βάση δεδομένων FlyBase μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας την αλληλουχία του DNA ή της πρωτεΐνης, με το όνομα του γονιδίου ή του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου ή μέσω όρων από τις διάφορες οντολογίες που χρησιμοποιούνται για τη λήψη λειτουργικών, φαινοτυπικών και ανατομικών δεδομένων. Το έργο FlyBase είναι αποτέλεσμα κοινοπραξίας ερευνητών και επιστημόνων που μελετούν τη *Drosophila* στο Πανεπιστήμιο του Χάρβαρντ και

στο Πανεπιστήμιο της Ιντιάνα στις Ηνωμένες Πολιτείες και στο Πανεπιστήμιο του Cambridge στο Ηνωμένο Βασίλειο.

Η βάση δεδομένων GTEx Portal (<https://gtexportal.org/home/>)



Για τη διερεύνηση της τοπολογίας του πρωτεϊνικού δικτύου της FRA10AC1 μέσω ανάλυσης των προτύπων γονιδιακής

έκφρασης σε διάφορους ιστούς χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα έκφρασης από τη βάση δεδομένων GTEx Portal (Genotype-Tissue Expression). Το GTEx Project ξεκίνησε το 2013 και στοχεύει στην ποσοτικοποίηση, συστηματική αποθήκευση και ανάλυση μεταγραφικών προτύπων από εκατοντάδες υγιείς δότες (Carithers & Moore, 2015).

Οι ιστοί που αναλύονται στο GTEx προέρχονται από οργανισμούς που ειδικεύονται στη συνεργασία με μετά θάνατον δότες και τις οικογένειές τους που δωρίζουν όργανα για μεταμόσχευση ή για έρευνα. Τα δεδομένα έκφρασης λαμβάνονται πειραματικά μετά από απομόνωση του ολικού RNA των ιστών, την παρασκευή του cDNA και την ανάλυση με αλληλούχηση χρησιμοποιώντας το Illumina TrueSeq RNA sequencing ή με μικροσυστοιχίες Affymetrix Human Gene 1.1 ST Expression Array (V3; 837 samples). Τα γονοτυπικά δεδομένα λαμβάνονται με αλληλούχηση πλήρους γονιδιώματος (HiSeq X; first batch on HiSeq 2000), αλληλούχηση εξονίων (Agilent or ICE target capture, HiSeq 2000) ή μικροσυστοιχίες για την εύρεση πολυμορφισμών του γονιδιώματος (Illumina OMNI 5M Array or 2.5M SNP Array) και μικροσυστοιχίες εύρεσης πολυμορφισμών των εξονίων (Illumina Human Exome SNP Array) (GTEx portal).

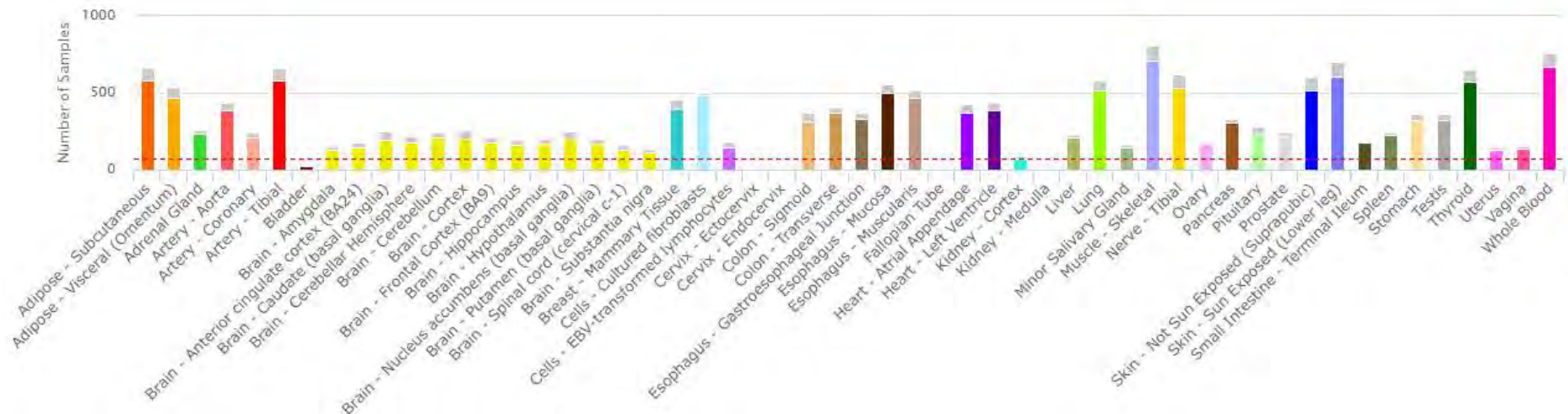
Η βάση δίνει δεδομένα για την έκφραση 56.200 κωδικών γονιδίων της Ensembl σε 51 ιστούς, στο αίμα και σε δύο κυτταρικές σειρές (Πίνακας 6, Εικόνα 22). Τα δεδομένα για κάθε γονίδιο παρέχονται μέσω portal στη μορφή διάμεσης τιμής αφθονίας όλων των μεταγράφων του που ποσοτικοποιούνται στα δείγματα (TPM).

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της συλλογής και ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων στα πλαίσια του προγράμματος GTEx είναι η έμφαση στην καθιέρωση τυποποιημένων διαδικασιών για όλες τις λειτουργικές πτυχές του έργου και τη συνεχή παρακολούθηση της τήρησής τους. Η ιδιαίτερη έμφαση που δίνεται στον ποιοτικό έλεγχο των βιολογικών δειγμάτων και των συναφών δεδομένων παρέχει υψηλό επίπεδο εμπιστοσύνης στα προκύπτοντα μοριακά δεδομένα, ένα ανεκτίμητο πλεονέκτημα που

στοχεύει στην παραγωγή θεμελιωδών δεδομένων σχετικά με την αλληλουχία του DNA και του RNA (Carithers & Moore, 2015).

Πίνακας 6: Στατιστικά στοιχεία της βάσης δεδομένων GTEx Portal. Πηγή: Διαδικτυακή διεπαφή της βάσης δεδομένων GTEx Portal (<https://www.gtexportal.org/home/>)

Ιστοί	Δότες	Δείγματα	Ensembl Gene IDs
54	948	17382	56200



Εικόνα 22: Ο αριθμός των δειγμάτων που έχουν αναλυθεί σε κάθε ιστό στη βάση δεδομένων GTEx Portal. Πηγή: Διαδικτυακή διεπαφή της βάσης δεδομένων GTEx Portal (<https://www.gtexportal.org/home/>)

Εργαλεία βιοπληροφορικής

Το εργαλείο βιοπληροφορικής HomoloGene



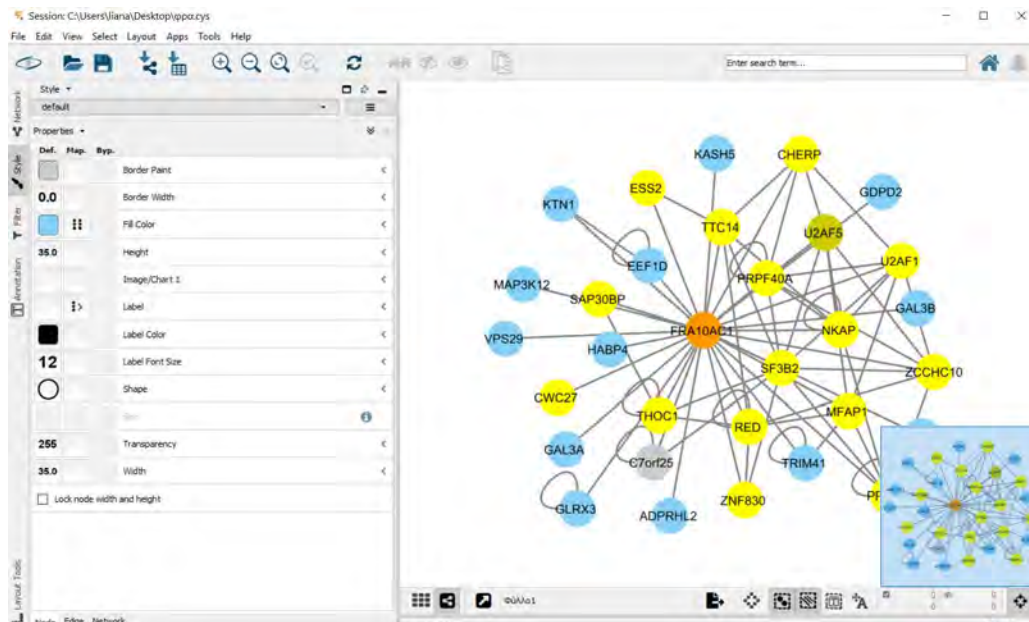
To HomoloGene

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>),

ένα εργαλείο του National Center for Biotechnology Information (NCBI), είναι ένα σύστημα που παρέχει τη δυνατότητα αυτοματοποιημένης ανίχνευσης ομολόγων γονιδίων ανάμεσα σε πλήρως αλληλουχημένα ευκαρυωτικά γονιδιώματα. Η ανίχνευση της ομολογίας στο εργαλείο HomoloGene γίνεται μέσω της ανάλυσης των πρωτεϊνών από διάφορους οργανισμούς. Οι ακολουθίες συγκρίνονται με τη χρήση του αλγορίθμου Protein BLAST (Altschul, et al., 1990), στη συνέχεια αντιστοιχίζονται και ομαδοποιούνται σε ομάδες, δημιουργώντας ένα φυλογενετικό δέντρο βάσει της ομοιότητας των αλληλουχιών.

Οπτικοποίηση δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με το εργαλείο βιοπληροφορικής Cytoscape

Για το σχεδιασμό των δικτύων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που παρουσιάζονται στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο βιοπληροφορικής Cytoscape (Shannon et al., 2003). Το Cytoscape (έκδοση 3.8.0) είναι ένα λογισμικό ανοιχτού κώδικα που επιτρέπει την ενσωμάτωση βιολογικών δεδομένων, όπως είναι δεδομένα έκφρασης υψηλής απόδοσης, αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων και άλλες μοριακές καταστάσεις σε ένα ενοποιημένο εννοιολογικό πλαίσιο. Το βασικό λογισμικό του Cytoscape παρέχει βασικές λειτουργίες για τη διάταξη και τη διερεύνηση του δικτύου, την ενσωμάτωση στο δίκτυο του προφίλ έκφρασης των μορίων, του φαινοτύπου και άλλων μοριακών καταστάσεων και τη σύνδεση του δικτύου με βάσεις λειτουργικών δεδομένων (Εικόνα 23). Το βασικό λογισμικό του εργαλείου μπορεί να επεκταθεί εύκολα με plug-ins, που επιτρέπουν την ανάπτυξη πρόσθετων υπολογιστικών αναλύσεων και χαρακτηριστικών.



Εικόνα 23: Στιγμιότυπο του εργαλείου Cytoscape.

Λογισμικό πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης ομικών προτύπων TM4 / MeV

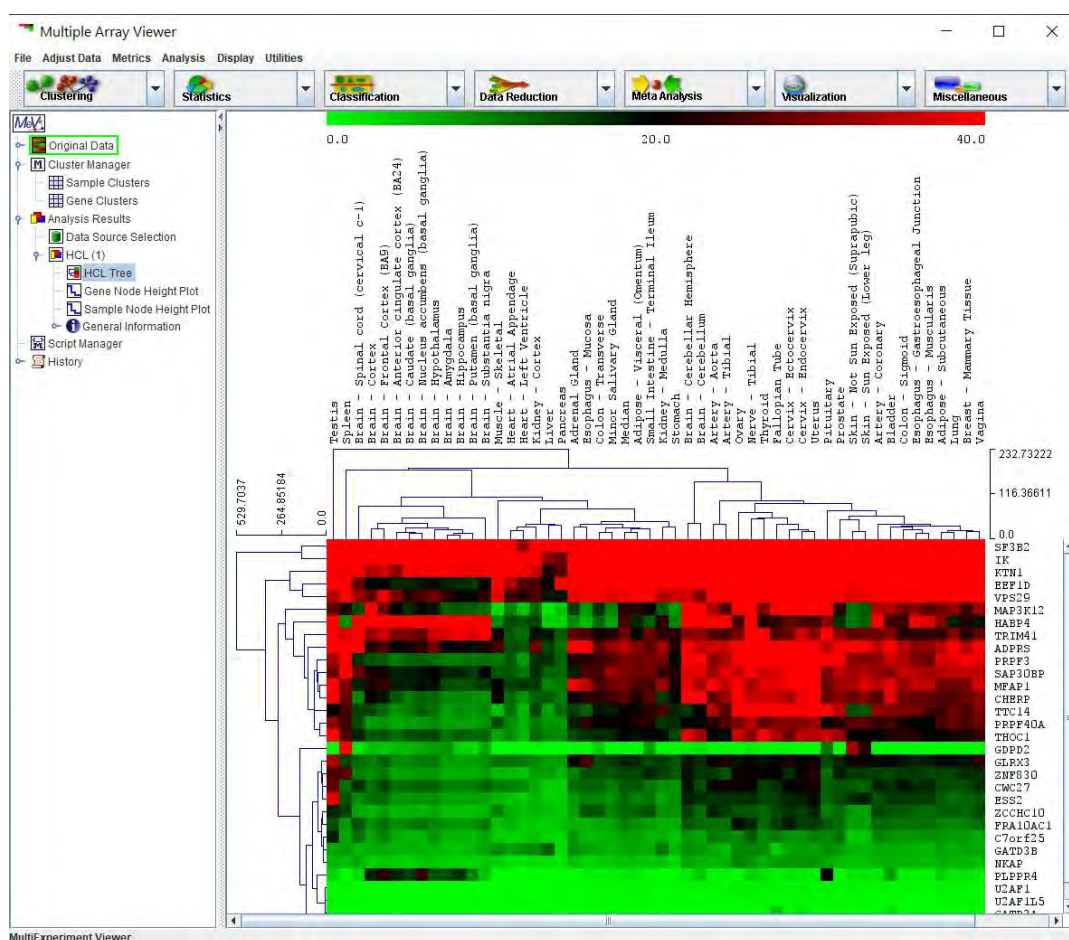
Για τη μαθηματική ανάλυση των δεδομένων έκφρασης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό TM4 / MeV (έκδοση 4.9.0), που είναι ένα λογισμικό ανοικτού κώδικα ανάλυσης δεδομένων. Το εργαλείο επιτρέπει την πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση βιολογικών δεδομένων, εφαρμόζοντας αλγορίθμους ομαδοποίησης, απεικόνισης, ταξινόμησης και στατιστικής ανάλυσης, οδηγώντας στην εξαγωγή βιολογικών συμπερασμάτων. Ως δεδομένα εισαγωγής χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα έκφρασης σε επίπεδο μεταγράφων που λήφθηκαν από τη βάση δεδομένων GTEx και στόχος ήταν η αναζήτηση γονιδίων με παρόμοιο μεταγραφικό πρότυπο, χρησιμοποιώντας μεθόδους πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης, βάσει του αλγορίθμου που υπάρχει στο λογισμικό TM4 / MeV. Το πρόγραμμα δίνει τη δυνατότητα οπτικοποίησης των δεδομένων σε θερμικό χάρτη (Εικόνα 24). Ο θερμικός χάρτης αποτελεί μία χρωματική απεικόνιση των προτύπων γονιδιακής έκφρασης που επιτρέπει να οπτικοποιηθούν γρήγορα συσχετίσεις και ιδιαίτερα χαρακτηριστικά σε ένα πολυπαραμετρικό σύνολο δεδομένων με βάση μια χρωματική κλίμακα. Κάθε στήλη του χάρτη απεικονίζει το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης ενός ιστού και κάθε γραμμή το πρότυπο έκφρασης ενός γονιδίου στους διάφορους ιστούς. Ο χρωματικός κώδικας στο επάνω μέρος δείχνει ότι

με κόκκινο απεικονίζεται η έκφραση ενός γονιδίου σε έναν ιστό εάν είναι πάνω από 20 και με πράσινο εάν είναι μικρότερη από 20 (Εικόνα 24).

Η ομαδοποίηση πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τον αλγόριθμο ιεραρχικής ομαδοποίησης (Hierarchical Clustering-HCL) που αφορά στη δημιουργία ενός δέντρου συσχέτισης μεταξύ των προτύπων έκφρασης των γονιδίων στους διάφορους ιστούς και μεταξύ των βιολογικών δειγμάτων ως προς το μεταγραφικό τους πρότυπο.

Τα δεδομένα ομαδοποιήθηκαν βάσει της Ευκλείδειας απόστασης, δηλαδή τα μεταγραφικά πρότυπα δειγμάτων που αφορούν σε παρόμοιες τιμές έκφρασης στους διάφορους ιστούς (Εικόνα 24). Η Ευκλείδεια απόσταση (ED) μεταξύ των μεταγραφικών προτύπων N γονιδίων δύο ιστών i και j δίνεται από τον τύπο:

$$ED_{ij} = \sqrt{(X1i - X1j)^2 + (X2i - X2j)^2 + \dots + (XNi - XNj)^2}$$



Εικόνα 24: Στιγμιότυπο του εργαλείου TM4 / MeV (έκδοση 4.9.0). Παρουσιάζεται η ιεραρχική ομαδοποίηση των γονιδίων και των ιστών βάση Ευκλείδειας απόστασης.

The screenshot displays the Multiple Array Viewer application window. The top menu bar includes File, Adjust Data, Metrics, Analysis, Display, and Utilities. Below the menu is a toolbar with icons for Clustering, Statistics, Classification, Data Reduction, Meta Analysis, Visualization, and Miscellaneous. The main workspace is divided into three panes:

- Left Pane (File Explorer):** Shows a hierarchical tree of data sources. Under "PTM - genes", several files are listed, including "Adipose - Subcutaneous", "Artery - Aorta", "Brain - Amygdala", "Brain - Cerebellum", "Brain - Cortex", "Brain - Frontal Cortex (BA9)", "Brain - Hypothalamus", "Brain - Nucleus accumbens (basal ganglia)", "Brain - Putamen (basal ganglia)", "Brain - Spinal cord (cervical c-1)", "Brain - Substantia nigra", "Breast - Mammary Tissue", "Cervix - Endocervix", "Colon - Sigmoid", "Colon - Transverse", "Esophagus - Gastroesophageal Junction", "Esophagus - Muscularis", "Esophagus - Mucosalis", "Fallopian Tube", "Heart - Atrial Appendage", "Heart - Left Ventricle", "Kidney - Cortex", "Kidney - Medulla", "Liver", "Lung", "Minor Salivary Gland", "Muscle - Skeletal", "Nerve - Tibial", "Ovary", "Pancreas", "Pituitary", "Prostate", "Skin - Not Sun Exposed (Suprapubic)", "Skin - Sun Exposed (Lower leg)", "Small Intestine - Terminal Ileum", "Spleen", "Stomach", "Testis", "Thyroid", "Uterus", "Vagina", and "Whole Blood".
- Middle Pane:** Displays a heatmap visualization of gene expression data. The y-axis lists genes, and the x-axis represents different samples or conditions. The color scale ranges from blue (low expression) to red (high expression).
- Right Pane:** Contains a table view of the data, showing columns for Gene ID, Gene Name, and Expression Level.

Πορεία για την ανακατασκευή του δικτύου άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με βάση το πρόσφατο πρωτεϊνικό δίκτυο του ανθρώπου και λειτουργικός χαρακτηρισμός των πρώτων γειτόνων της FRA10AC1

Για τη συμβολή στη λειτουργική διερεύνηση του βιοχημικού ρόλου της FRA10AC1 χρησιμοποιώντας εργαλεία βιοπληροφορικής αρχικά έγινε αναζήτηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 στη βάση δεδομένων PICKLE 2.5. Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 σχεδιάστηκε χρησιμοποιώντας το εργαλείο βιοπληροφορικής Cytoscape 3.8.0. Στη συνέχεια, έγινε εξόρυξη πληροφοριών σχετικά με τα μέλη του δικτύου στη βάση δεδομένων UniProt χρησιμοποιώντας το UniProt ID Accession (Εικόνα 26). Συγκεκριμένα λήφθηκαν οι αναγνωριστικοί κωδικοί: Protein names, Gene names, Gene names (primary), Gene ID, HGNC, MalaCards, MIM, GeneCards και Ensembl. Για τη διερεύνηση της λειτουργίας

των πρωτεϊνών έγινε λήψη των πληροφοριών: Subcellular location, Gene ontology (cellular component), Gene ontology (biological process), Gene ontology (molecular function), Function, EC number και Involvement in disease. Επιπλέον, λήφθηκαν πληροφορίες σχετικά με το μήκος της πρωτεΐνης (Length), την ιστοειδικότητά της (Tissue specificity) και λέξεις κλειδιά για αυτή (Keywords).



Εικόνα 26: Η πορεία για την ανακατασκευή του δικτύου άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 και το λειτουργικό χαρακτηρισμό των πρώτων γειτόνων της.

Πορεία για τη διεύρυνση του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με δεδομένα από ορθόλογες πρωτεΐνες

Ο επόμενος στόχος ήταν η διεύρυνση του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιώντας δεδομένα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων από ορθόλογες πρωτεΐνες. Αρχικά έγινε αναζήτηση των ορθόλογων πρωτεϊνών της FRA10AC1 στη βάση δεδομένων του NCBI Gene και χρησιμοποιώντας το εργαλείο βιοπληροφορικής HomoloGene και στη συνέχεια έγινε αναζήτηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων των ορθόλογων στις βάσεις δεδομένων BioGRID και IntAct. Οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν οι ορθόλογες της FRA10AC1 αντιστοιχήθηκαν με τις ορθόλογες του ανθρώπου χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων FlyBase database και το εργαλείο βιοπληροφορικής του NCBI HomoloGene. Ενσωματώνοντας δεδομένα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων από τις ορθόλογες πρωτεΐνες ανακατασκευάστηκε το διευρυμένο δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 (Εικόνα 27).



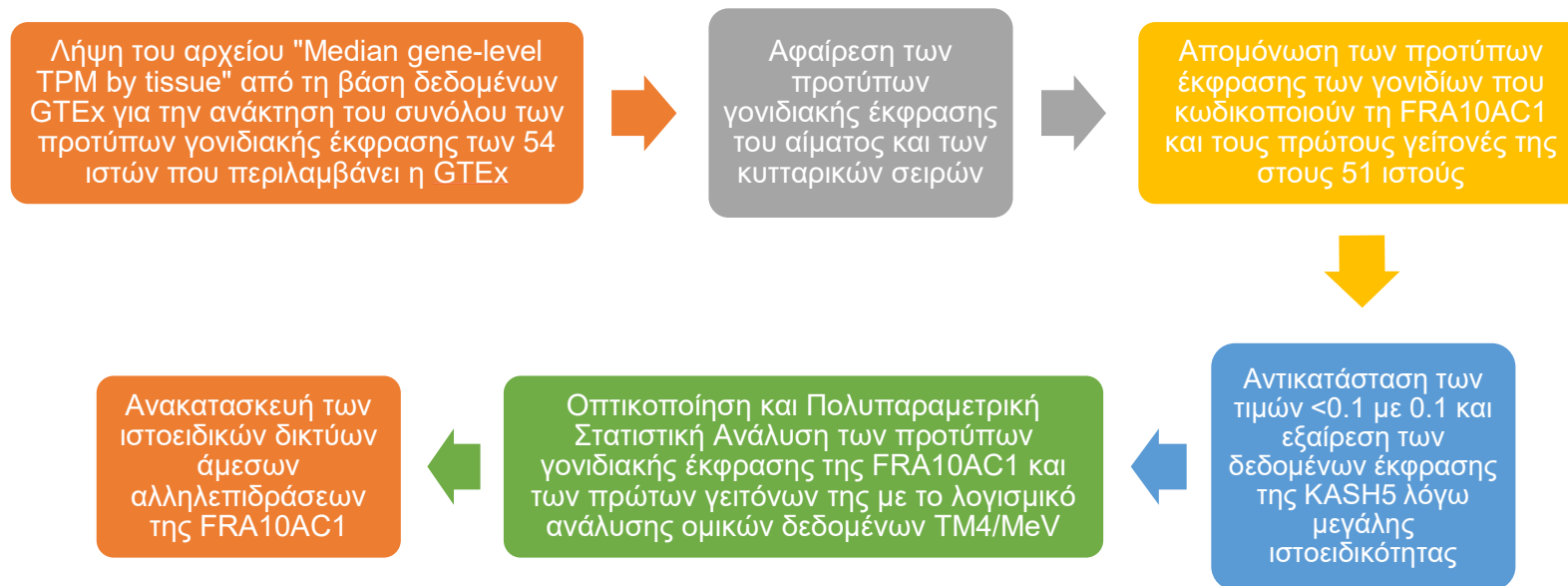
Εικόνα 27: Η πορεία για τη διεύρυνση του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με δεδομένα από ορθόλογες πρωτεΐνες.

Πορεία για την ανάκτηση των μεταγραφικών προτύπων της FRA10AC1 και των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά από τη βάση δεδομένων GTEx και ανάλυσή τους συνδυαστικά με μεθόδους πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης και εξόρυξης γνώσης

Για τη μελέτη των μελών του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 χρησιμοποιώντας δεδομένα έκφρασης έγινε λήψη του αρχείου “Median gene-level TPM by tissue” από την καρτέλα Data Download της βάσης δεδομένων GTEx. Το αρχείο αυτό περιλαμβάνει τη μέση τιμή έκφρασης των μεταγράφων κάθε γονιδίου που έχει μελετηθεί σε 51 ανθρώπινους ιστούς, στο αίμα και σε δύο κυτταρικές σειρές (Cultured fibroblasts, EBV-transformed lymphocytes). Λήφθηκαν και επεξεργάστηκαν μόνο τα δεδομένα έκφρασης που αφορούσαν ιστούς. Η ταυτοποίηση των γονιδίων στο αρχείο με τα δεδομένα έκφρασης που δίνεται από την GTEx γίνεται με το όνομα του γονιδίου (Description) και το Ensembl ID (Name). Η αναζήτηση των δεδομένων έκφρασης των μελών του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 έγινε χρησιμοποιώντας το Gene names (primary) που δίνεται από τη UniProt. Για όσες πρωτεΐνες δεν αντιστοιχήθηκαν έγινε αντιστοίχιση του αναγνωριστικού κωδικού του μεταγράφου στον κωδικό του γονιδίου (Ensembl ID) μέσω της βάσης δεδομένων PICKLE και έγινε αναζήτηση των προτύπων έκφρασης με αυτό (Εικόνα 28).

Τα δεδομένα έκφρασης επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης MeV. Για να αποφευχθούν μαθηματικά σφάλματα τα δεδομένα έκφρασης με τιμές μικρότερες του 0.1 αντικαταστάθηκαν με την τιμή 0.1, καθώς αγγίζουν το όριο ανιχνευσιμότητας της μεθόδου και δεν είναι εμπιστεύσιμες. Επίσης,

εξαιρέθηκαν από την ανάλυση τα δεδομένα έκφρασης της KASH5 λόγω σημαντικής ιστοειδικότητας. Στη συνέχεια, τα δεδομένα έκφρασης των πρωτεϊνών σε κάθε ιστό χρησιμοποιήθηκαν για την ανακατασκευή ιστοειδικών δικτύων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Το μέγεθος των κόμβων καθορίστηκε ανάλογο της έκφρασης κάθε πρωτεΐνης στον ιστό αυτό. Οι πρωτεΐνες που είχαν τιμή έκφρασης μικρότερη του 0.1 εξαιρέθηκαν από το δίκτυο (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Η πορεία για την ανάκτηση των μεταγραφικών προτύπων της FRA10AC1 και των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά από τη βάση δεδομένων GTEx και ανάλυσή τους συνδυαστικά με μεθόδους πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης και εξόρυξης γνώσης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αποτελέσματα μοριακών τεχνικών με στόχο την ανάπτυξη κλώνων κυττάρων *HeLa* υπερέκφρασης του *FRA10AC1*

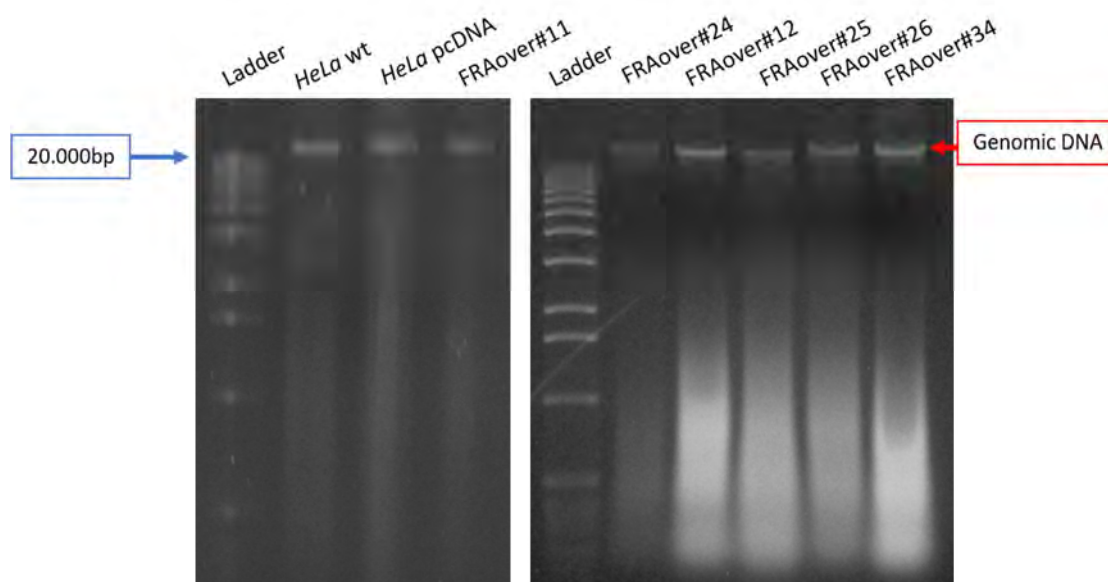
Γονιδιωματικός έλεγχος των κλώνων κυττάρων *HeLa* που έχουν διαμολυνθεί με τον πλασμιδιακό φορέα *FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C

Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Από προπαρασκευαστικά πειράματα είχαμε αναπτύξει κλώνους κυττάρων *HeLa* που είχαν υποστεί διαμόλυνση με τον πλασμιδιακό φορέα *FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C. Βασισμένοι σε πειράματα προσδιορισμού της έκφρασης του *FRA10AC1* σε επίπεδο μεταγράφου και πρωτεΐνης επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση οι κλώνοι κυττάρων: *HeLa*-FRAover#11, *HeLa*-FRAover#12, *HeLa*-FRAover#24, *HeLa*-FRAover#25, *HeLa*-FRAover#26 και *HeLa*-FRAover#34. Από τους κλώνους κυττάρων που επιλέχθηκαν και από κύτταρα ελέγχου *HeLa* αγρίου τύπου (*HeLa* wt) και κύτταρα *HeLa* διαμολυσμένα με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1/His B (*HeLa*-pcDNA) έγινε απομόνωση γονιδιωματικού DNA, το οποίο ελέγχθηκε ποιοτικά και ποσοτικά με φασματοφωτομέτρηση (Πίνακας 7) και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 29). Η ηλεκτροφόρηση του DNA έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8%. Ως μάρτυρας μοριακών μεγεθών χρησιμοποιήθηκε ο «1kb DNA Ladder». Το ακέραιο γονιδιωματικό DNA εμφανίζεται στην ηλεκτροφόρηση ως μια ζώνη μήκους περίπου 30.000 bp. Στα δείγματα *HeLa*-FRAover#12, *HeLa*-FRAover#25, *HeLa*-FRAover#26 και *HeLa*-FRAover#34 παρατηρείται μια επιμήκης ζώνη DNA στο κάτω μέρος του πηκτώματος. Η ζώνη αυτή αποτελείται από τμήματα που έχουν προκύψει από τυχαίο κατακερματισμό των μεγάλων τμημάτων, τα οποία αποτελούνται από ένα συνεχές φάσμα μεγεθών, δημιουργώντας μια συνεχή ζώνη.

Πίνακας 7: Τα αποτελέσματα της φασματοφωτομέτρησης του διαλύματος απομονωμένου DNA των κλώνων κυττάρων *HeLa*-FRAover#11, *HeLa*-FRAover#12, *HeLa*-FRAover#24, *HeLa*-FRAover#25, *HeLa*-FRAover#26 και *HeLa*-FRAover#34 και των κυττάρων ελέγχου *HeLa* wt και *HeLa*-pcDNA.

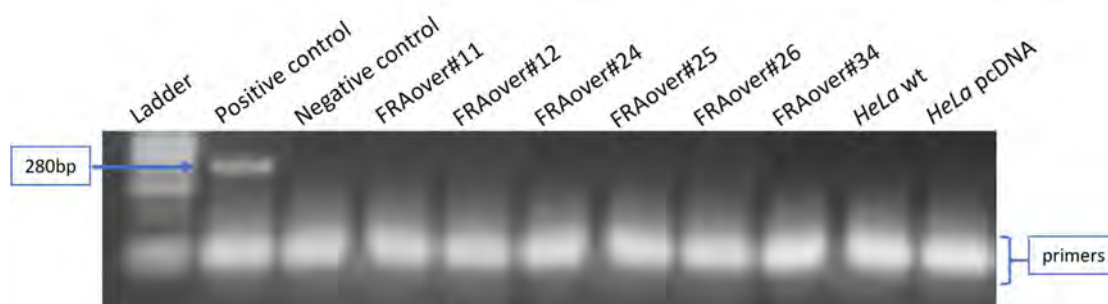
Κλώνος	DNA Concentration (ng / μ l)	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀
<i>HeLa</i> wt	1230.36	1.906
<i>HeLa</i> -pcDNA	666.55	2.099
<i>HeLa</i> -FRA#11	94.85	2.121
<i>HeLa</i> -FRA#12	195.75	2.092
<i>HeLa</i> -FRA#24	62.75	2.011
<i>HeLa</i> -FRA#25	248.5	2.099
<i>HeLa</i> -FRA#26	67.5	1.988
<i>HeLa</i> -FRA#34	170	2.015



Εικόνα 29: Η ηλεκτροφόρηση του απομονωμένου γονιδιωματικού DNA των κλώνων κυττάρων *HeLa*-FRAover#11, *HeLa*-FRAover#12, *HeLa*-FRAover#24, *HeLa*-FRAover#25, *HeLa*-FRAover#26 και *HeLa*-FRAover#34 και των κυττάρων ελέγχου *HeLa* wt και *HeLa*-pcDNA.

Αποτελέσματα PCR για τον έλεγχο της μόλυνσης από μυκόπλασμα

Για τον έλεγχο των κλώνων για μυκόπλασμα πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο γονιδιωματικό DNA από τους κλώνους *HeLa-FRAover#11*, *HeLa-FRAover#12*, *HeLa-FRAover#24*, *HeLa-FRAover#25*, *HeLa-FRAover#26* και *HeLa-FRAover#34* και τα κύτταρα ελέγχου *HeLa wt* και *HeLa-pcDNA*. Ως θετικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκε DNA που έχει απομονωθεί από κυτταρική σειρά μολυσμένη από μυκόπλασμα και ως αρνητικός έλεγχος αντίδραση στην οποία περιέχονται όλα τα αντιδραστήρια, εκτός από δείγμα DNA. Η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα μεγεθών το «100bp DNA Ladder». Το αναμενόμενο μέγεθος του τμήματος DNA που ενισχύεται είναι 280 bp (Εικόνα 30).



Εικόνα 30: Η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων PCR για την ανίχνευση του μυκοπλάσματος. Ως θετικός έλεγχος (Positive control) χρησιμοποιήθηκε απομονωμένο DNA από κυτταρική σειρά μολυσμένη από μυκόπλασμα. Ως αρνητικός έλεγχος (Negative control) χρησιμοποιήθηκε αντίδραση στην οποία περιέχονταν όλα τα αντιδραστήρια, εκτός από δείγμα DNA.

Η ηλεκτροφόρηση έδωσε ζώνη DNA μεγέθους 280 bp μόνο στην αντίδραση θετικού ελέγχου, δείχνοντας ότι οι κυτταροκαλλιέργειες που ελέγχθηκαν δεν είναι μολυσμένες από μυκόπλασμα.

Αποτελέσματα PCR για τον έλεγχο της ακεραιότητας του διαγονιδίου *FRA10AC1*

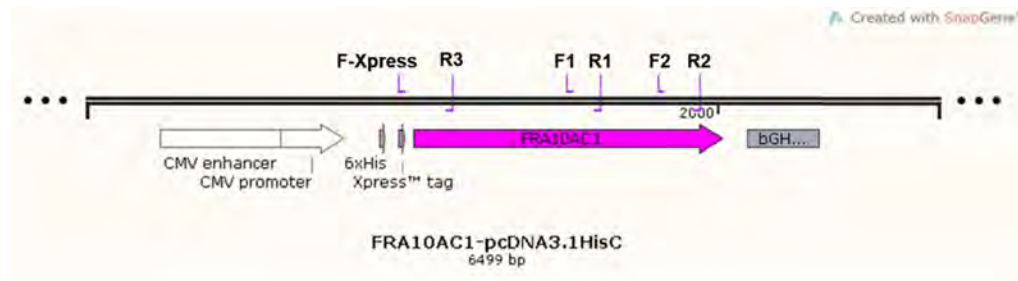
Για να επιβεβαιωθεί ότι το διαγονίδιο έχει εισέλθει ακέραιο στο γονιδίωμα των κυττάρων που διαμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα *FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C, πραγματοποιήθηκε μια σειρά αντιδράσεων PCR, χρησιμοποιώντας ως δείγμα γονιδιωματικό DNA που απομονώθηκε από τους κλώνους *HeLa-FRAover#11*, *HeLa-FRAover#12*, *HeLa-FRAover#24*, *HeLa-FRAover#25*, *HeLa-FRAover#26* και *HeLa-FRAover#34*. Οι αντιδράσεις έγιναν χρησιμοποιώντας εκκινητές που υβριδοποιούνται

στο διαγονίδιο και στον επίτοπο Xpress που βρίσκεται στην πλασμιδιακή κατασκευή, πριν τη θέση ένθεσης του διαγονιδίου. Ως θετικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA *FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C και ως αρνητικός έλεγχος DNA που έχει απομονωθεί από κύτταρα ελέγχου *HeLa* wt και *HeLa*-pcDNA. Τα κύτταρα ελέγχου *HeLa* wt και *HeLa*-pcDNA έχουν στο γονιδιώμά τους το ενδογενές *FRA10AC1*, αλλά όχι το διαγονίδιο. Οι εκκινητές υβριδοποιούνται σε διαφορετικά εξόνια του *FRA10AC1*, επομένως δεν μπορεί να γίνει ενίσχυση του ενδογενούς γονιδίου. Στην Εικόνα 31 παρουσιάζονται οι θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν. Το αναμενόμενο μέγεθος των τμημάτων που ενισχύονται από κάθε ζεύγος εκκινητών είναι:

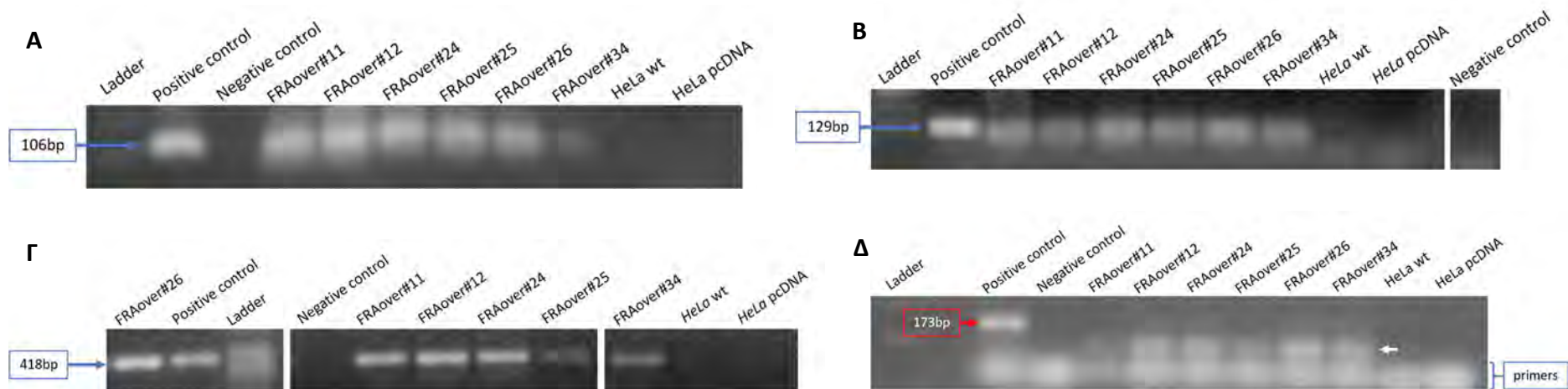
- F1 / R1: 106 bp
- F2 / R2: 129 bp
- F1 / R2: 418 bp
- F-Xpress / R3: 173 bp

Η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5%. Ως μάρτυρας μοριακών μεγεθών χρησιμοποιήθηκε ο «pcDNA3.1/HisB x *DdeI*». Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 32.

Παρατηρείται ότι πράγματι τα μεγέθη των τμημάτων DNA που ενισχύθηκαν από κάθε αντίδραση PCR ταιριάζουν με το αναμενόμενο στις αντιδράσεις που χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών F1 / R1, F2 / R2 και F1 / R2, υποδεικνύοντας ότι το διαγονίδιο στην περιοχή ανάμεσα στα σημεία υβριδοποίησης των εκκινητών F1 και R2 είναι ακέραιο (Εικόνα 32-A, B, Γ). Στην αντίδραση PCR όπου χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών F-Xpress / R3, ο θετικός έλεγχος (πλασμιδιακό DNA pcDNA3.1/HisB) έδωσε τμήμα DNA με το αναμενόμενο μέγεθος. Ωστόσο, η αντίδραση PCR με υπόστρωμα γονιδιωματικό DNA από τους κλώνους έδωσε τμήμα μικρότερου μεγέθους, υποδεικνύοντας ότι πιθανώς υπάρχει κάποιο έλλειμμα στην περιοχή ανάμεσα στα σημεία υβριδοποίησης των εκκινητών F-Xpress και R3 (Εικόνα 32-Δ).



Εικόνα 31: Τμήμα της πλασμιδιακής κατασκευής *FRA10AC1*-pcDNA3.1HisC. Στην εικόνα παρουσιάζονται οι θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR.



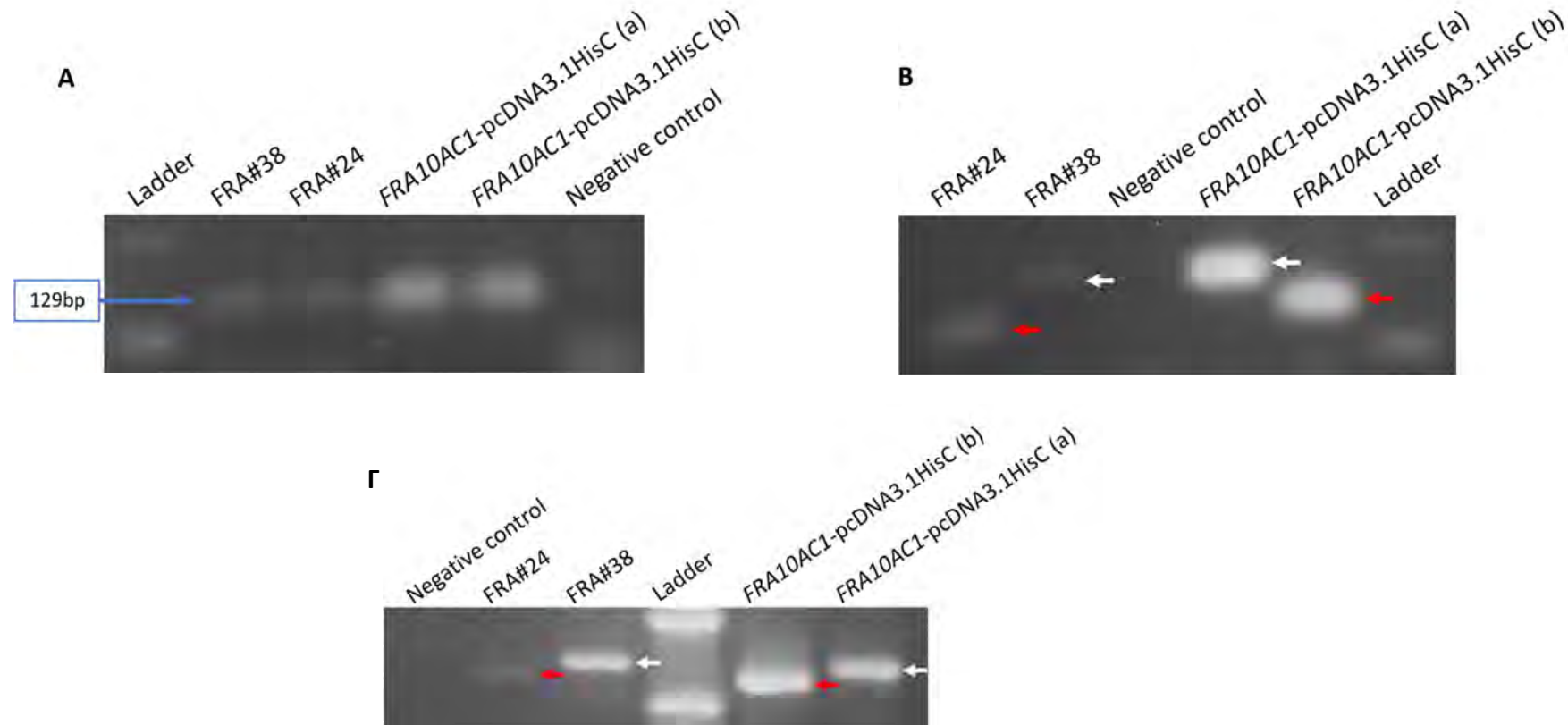
Εικόνα 32: Η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων PCR με τα ζεύγη εκκινητών Α: F1 / R1, Β: F2 / R2, Γ: F1 / R2, Δ: F-Xpress / R3. Ως θετικός έλεγχος (Positive control) χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA pcDNA3.1/HisB. Ως αρνητικός έλεγχος (Negative control) χρησιμοποιήθηκε αντίδραση στην οποία περιέχονταν όλα τα αντιδραστήρια, εκτός από δείγμα DNA. Δ: Με λευκό βέλος υποδεικνύεται το τμήμα DNA που ενισχύθηκε από το γονιδιωματικό DNA των κλώνων, του οποίου το μέγεθος είναι μικρότερο από το αναμενόμενο, που βλέπουμε στο θετικό έλεγχο.

Έλεγχος της ακεραιότητας της πλασμιδιακής κατασκευής που χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση των κλώνων κυττάρων *HeLa*

Στα προκαταρκτικά πειράματα που είχαν γίνει με στόχο τη δημιουργία κλώνων κυττάρων *HeLa* που υπερεκφράζουν το γονίδιο *FRA10AC1*, η πλασμιδιακή κατασκευή *FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηρίων *E. coli*, προκειμένου να παραχθεί μεγάλη ποσότητα πλασμιδίου. Στη συνέχεια, απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA από ένα βακτηριακό κλώνο και χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων *HeLa*. Τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR, όπου ενισχύθηκε τμήμα του γονιδιωματικού DNA των κλώνων χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών F-Xpress / R3, έδειξαν ότι πιθανώς υπάρχει ένα έλλειμμα στην περιοχή ανάμεσα στις θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών, αφού το τμήμα DNA που ενισχύθηκε είχε μικρότερο μέγεθος από το αναμενόμενο.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί αν πράγματι στο διαγονίδιο που έχει ενσωματωθεί στους κλώνους που αναπτύχθηκαν υπάρχει έλλειμμα στην περιοχή αυτή, έγινε απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τον κλώνο #38, ο οποίος είχε αναπτυχθεί παλαιότερα στα πλαίσια μιας πρωτύτης προσπάθειας ανάπτυξης κλώνων κυττάρων που υπερεκφράζουν το *FRA10AC1*. Για την ανάπτυξη του κλώνου είχε ακολουθηθεί η ίδια πειραματική πορεία, ωστόσο στη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε κυκλικό πλασμίδιο *FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C. Σύμφωνα με τη φασματοφωτομέτρηση, το DNA που απομονώθηκε από τον κλώνο #38 είχε συγκέντρωση 561.96 ng / μl και OD₂₆₀ / OD₂₈₀ 1.936. Στην Εικόνα 33 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αντιδράσεων PCR με τα ζεύγη εκκινητών F2 / R2, F-Xpress / R3 και F-Xpress / R1, όπου χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο γονιδιωματικό DNA που απομονώθηκε από τους κλώνους *HeLa*-FRAover#24 και #38, το πλασμιδιακό DNA που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηρίων (*FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C (a)) και αυτό που απομονώθηκε από το βακτηριακό κλώνο (*FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C (b)). Ως αρνητικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκε αντίδραση, η οποία περιείχε όλα τα αντιδραστήρια, χωρίς δείγμα DNA. Η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων έγινε σε πήκτωμα αгарόζης 1.5%. Τα αναμενόμενα μεγέθη των τμημάτων που ενισχύονται είναι:

- F2 / R2: 129 bp
- F-Xpress / R3: 173 bp
- F-Xpress / R1: 641 bp



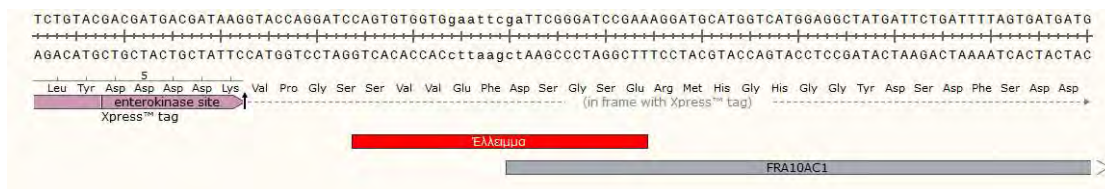
Εικόνα 33: Η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων PCR με τα ζεύγη εκκινητών A: F2 / R2, B: F-Xpress / R3, Γ: F-Xpress / R1. Ως αρνητικός έλεγχος (Negative control) χρησιμοποιήθηκε αντίδραση στην οποία περιέχονταν όλα τα αντιδραστήρια, εκτός από δείγμα DNA. Με λευκό βέλος υποδεικνύονται τα τμήματα DNA που έχουν το αναμενόμενο μέγεθος. Τα τμήματα αυτά παράχθηκαν από την ενίσχυση του γονιδιωματικού DNA του κλώνου #38 και του πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των βακτηρίων (*FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C (a)). Με κόκκινο βέλος υποδεικνύονται τα τμήματα DNA που προέκυψαν από την ενίσχυση του γονιδιωματικού DNA του κλώνου *HeLa*-FRAover#24 και του πλασμιδίου που απομονώθηκε από το βακτηριακό κλώνο (*FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C (b)), των οποίων το μέγεθος είναι μικρότερο από το αναμενόμενο.

Από την ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων παρατηρείται ότι η ενίσχυση των γονιδιωματικών DNA του κλώνου #38 και *HeLa-FRAover#24*, του πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των βακτηρίων *E. coli* (*FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C (a)) και του πλασμιδίου που απομονώθηκε από το βακτηριακό κλώνο (*FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C (b)) με το ζεύγος εκκινητών F2 / R2 έδωσε σε όλες τις αντιδράσεις τμήματα αναμενόμενου μεγέθους (129 bp). Επομένως, στην περιοχή που περικλείεται από τις θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών F2 και R2 το διαγονίδιο είναι ακέραιο.

Στις αντιδράσεις PCR όπου χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών F-Xpress / R3 και F-Xpress / R1 παρατηρείται ότι τα τμήματα που παράγονται από την ενίσχυση του πλασμιδίου που απομονώθηκε από το βακτηριακό κλώνο (*FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C (b)) και το γονιδιωματικό DNA του κλώνου *HeLa-FRAover#24* είναι μικρότερα από το αναμενόμενο μέγεθος που παρατηρείται στα τμήματα που ενισχύονται στο πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των βακτηρίων (*FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C (a)) και το γονιδιωματικό DNA του κλώνου #38. Αυτό αποδεικνύει ότι κατά το μετασχηματισμό των βακτηρίων και τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδίου μέσα σε αυτά, συνέβη μια μετάλλαξη στην περιοχή που περικλείεται από τις θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών F-Xpress και R3.

Προκειμένου να διερευνηθεί η διαφορά που παρατηρείται, έγινε ενίσχυση του πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηρίων (*FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C (a)) και του πλασμιδίου που απομονώθηκε από το βακτηριακό κλώνο (*FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C (b)) με το ζεύγος εκκινητών F-Xpress και R1. Τα τμήματα που παράχθηκαν από κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν για αλληλούχηση, η οποία πραγματοποιήθηκε στην εταιρεία CeMIA (Cellular and Molecular Immunological Applications). Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής BioEdit (Hall, 1999).

Από τη σύγκριση της αλληλουχίας των δύο πλασμιδίων παρατηρήθηκε ότι το πλασμίδιο που απομονώθηκε από το βακτηριακό κλώνο (*FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C (b)) έφερε έλλειμα μήκους 33 bp. Από το πλασμίδιο έλειπε τμήμα της περιοχής ανάμεσα στον επίτοπο Xpress και το διαγονίδιο, καθώς και ένα τμήμα από το διαγονίδιο (Εικόνα 34).



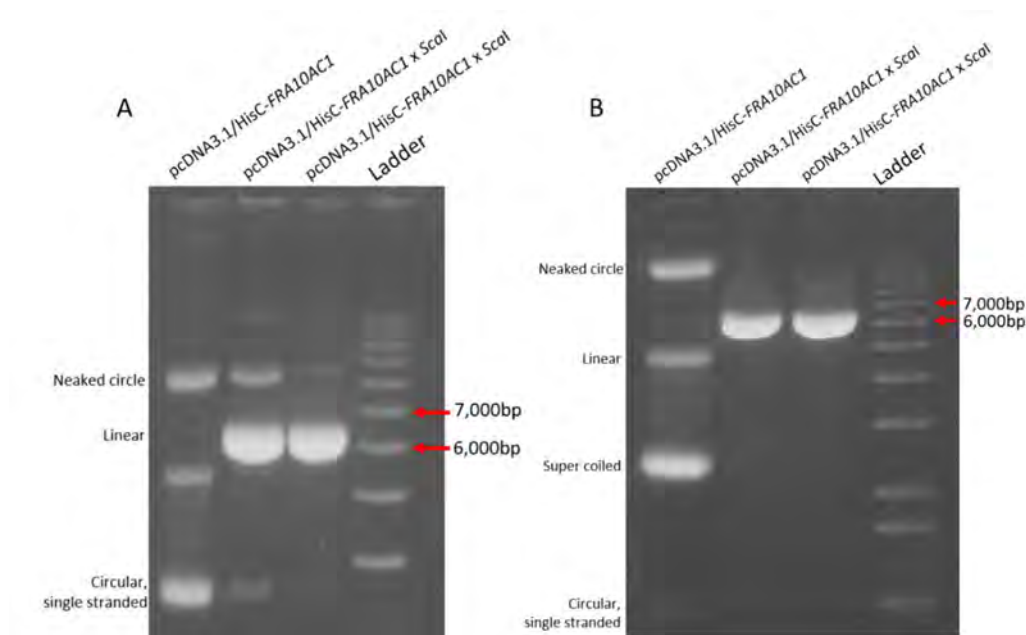
Εικόνα 34: Τμήμα της πλασμιδιακής κατασκευής *FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C. Στην εικόνα επισημαίνεται η περιοχή που απουσιάζει από το πλασμίδιο που απομονώθηκε από το βακτηριακό κλώνο (*FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C (b)). Το έλλειμμα έχει μήκος 33 bp.

Δημιουργία κλώνων κυττάρων *HeLa* που υπερεκφράζουν το *FRA10AC1*

Η αλληλούχηση του πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση των κλώνων κυττάρων που είχαν αναπτυχθεί έδειξε ότι φέρει έλλειμμα που περιλαμβάνει την περιοχή ανάμεσα στον επίτοπο Xpress και το διαγονίδιο, καθώς και ένα τμήμα του διαγονιδίου. Παρά το ότι το έλλειμμα είχε μήκος 33 bp, επομένως δεν επηρεάζεται το πλαίσιο ανάγνωσης του υπόλοιπου πολυπεπτιδίου, δεν μπορούμε να γνωρίζουμε τι επιπτώσεις μπορεί να έχει το έλλειμμα αυτό στη λειτουργικότητα της παραγόμενης χημικής πρωτεΐνης FRA10AC1. Έτσι, επιλέχθηκε να αναπτυχθούν νέοι κλώνοι κυττάρων *HeLa* που θα υπερεκφράζουν το γονίδιο *FRA10AC1*, παραλείποντας το βήμα μετασχηματισμού βακτηρίων, ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα να δημιουργηθεί ξανά έλλειμμα.

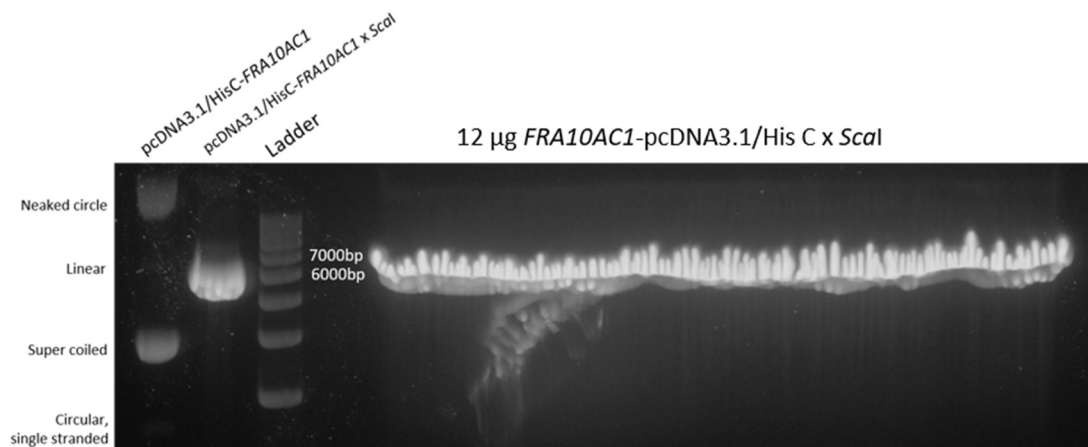
Γραμμοποίηση πλασμιδιακού DNA

Το πρώτο βήμα για την παραγωγή νέων κλώνων ήταν η γραμμοποίηση της πλασμιδιακής κατασκευής. Πραγματοποιήθηκε γραμμοποίηση 14 μg πλασμιδίου σε δύο αντιδράσεις, προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση. Περίπου 500 ng DNA από κάθε αντίδραση ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% για να ελεγχθεί η απόδοση της αντίδρασης. Παράλληλα, ηλεκτροφορήθηκαν 300 ng άκοπο πλασμιδιακό DNA για να συγκριθεί το πρότυπο ηλεκτροφόρησης. Ως μάρτυρας μοριακών μεγεθών χρησιμοποιήθηκε ο «1kb DNA Ladder» (Εικόνα 35A). Επειδή η ηλεκτροφόρηση έδειξε ότι η πέψη δεν είχε πλήρη απόδοση, στις αντιδράσεις προστέθηκαν ακόμη 2 λ ενζύμου περιορισμού (10 U / μl) και μετά από ολονύκτια επώαση επαναλήφθηκε η ηλεκτροφόρηση ελέγχου της απόδοσης (Εικόνα 35B).

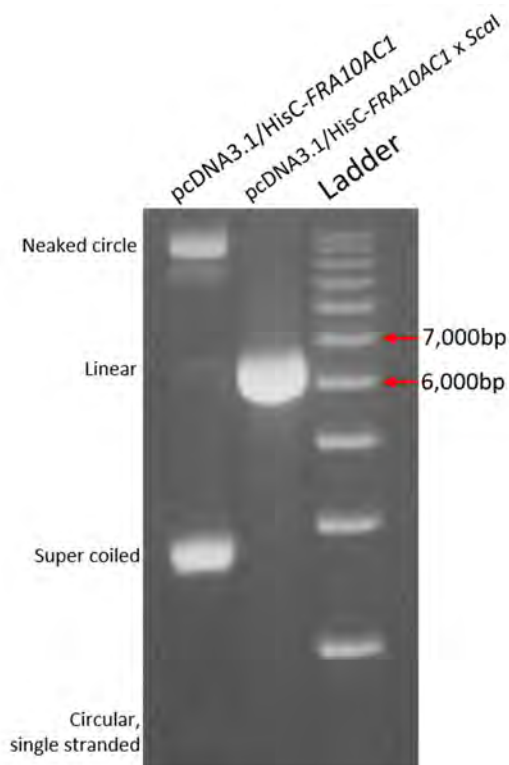


Εικόνα 35: Ηλεκτροφόρηση των πέψεων *FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C x *ScaI*. A: Παρατηρείται ότι η πέψη δεν είχε πλήρη απόδοση, για αυτό έγινε επώαση με επιπλέον ένζυμο περιορισμού. B: Η προσθήκη επιπλέον ενζύμου περιορισμού οδήγησε σε πλήρη απόδοση των πέψεων.

Μετά την επιβεβαίωση της πλήρους απόδοσης της πέψης, πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική ηλεκτροφόρηση, προκειμένου να γίνει απομόνωση του γραμμοποιημένου πλασμιδιακού DNA, με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel Γερμανίας, Cat.No 740609.10) (Εικόνα 36). Το γραμμοποιημένο πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ελέγχθηκε ποιοτικά και ποσοτικά με φασματοφωτόμετρο Quawell 5000. Σύμφωνα με αυτό, το πλασμιδιακό DNA βρίσκεται σε συγκέντρωση 364 ng / μl στο διάλυμα έκλουσης 1 και σε συγκέντρωση 216 ng / μl. Ο λόγος που δείχνει την καθαρότητα των διαλυμάτων ήταν 1.82 και 1.83 αντίστοιχα. Επιπλέον, το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA ελέγχθηκε ποιοτικά με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 0.8%. Παράλληλα έγινε ηλεκτροφόρηση 300 ng άκοπου πλασμιδιακού DNA για τη σύγκριση του προτύπου ηλεκτροφόρησης, καθώς και 500 ng DNA από την πέψη (Εικόνα 37).



Εικόνα 36: Η παρασκευαστική ηλεκτροφόρηση που πραγματοποιήθηκε για την απομόνωση του γραμμοποιημένου πλασμιδίου *FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C από το διάλυμα της πέψης.



Εικόνα 37: Ηλεκτροφόρηση του γραμμοποιημένου πλασμιδιακού DNA *FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C μετά την απομόνωση από το πήκτωμα αγαρόζης της παρασκευαστικής ηλεκτροφόρησης.

Επιλογή κλώνων κυττάρων *HeLa* που υπερεκφράζουν το *FRA10AC1* μετά από διαμόλυνση με το πλασμίδιο *FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C

Το γραμμοποιημένο πλασμίδιο *FRA10AC1*-pcDNA3.1/His C χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων *HeLa*. Μετά το πέρας δύο εβδομάδων έγινε επιλογή 24 κλώνων, οι οποίοι καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 12 θέσεων. Προκειμένου να γίνει διάκριση από τους κλώνους που είχαν αναπτυχθεί παλαιότερα και περιείχαν το διαγονίδιο που έφερε το έλλειμα, οι νέοι κλώνοι ονομάστηκαν FO# (*FRA10AC1* Overexpression). Μετά την απομόνωση των κλώνων, οι κλώνοι FO#1, FO#5, FO#10, FO#14 και FO#22 έπαψαν να καλλιεργούνται γιατί αποτελούνταν από πολύ μικρό αριθμό κυττάρων και δεν αναπτύσσονταν ομαλά.

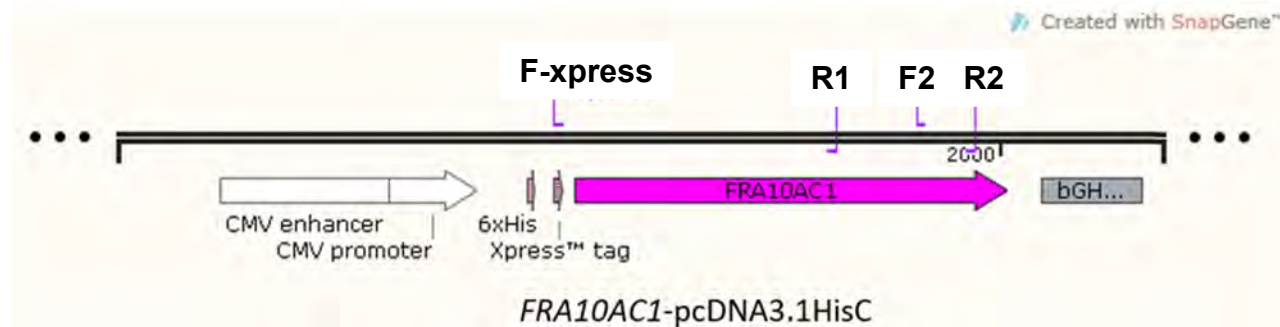
Εκτίμηση της έκφρασης του *FRA10AC1* στους κλώνους σε επίπεδο mRNA

Για την εκτίμηση της έκφρασης του διαγονιδίου *FRA10AC1* στους κλώνους έγινε απομόνωση ολικού RNA από κάθε κλώνο και παρασκευή cDNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις PCR με 25 θερμικούς κύκλους για την ημιποσοτική εκτίμηση της έκφρασης του γονιδίου. Το RNA ελέγχθηκε ποιοτικά και ποσοτικά με φασματοφωτομέτρηση. Τα αποτελέσματα της φασματοφωτομέτρησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

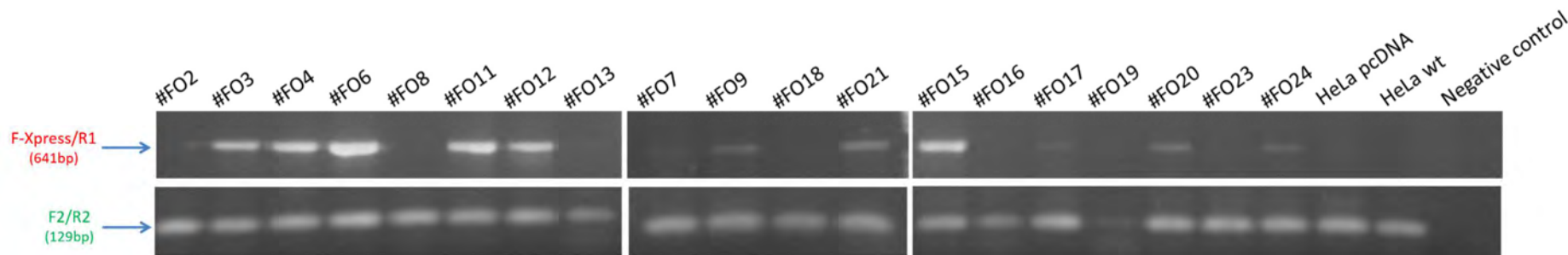
Στις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών F-Xpress / F1 και F2 / R2 (Εικόνα 38). Ως αρνητικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκε αντίδραση στην οποία περιέχονταν όλα τα αντιδραστήρια, εκτός από δείγμα DNA. Η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5%, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα μοριακών μεγεθών το «pcDNA3.1/HisC-*FRA10AC1* x *DdeI*» (Εικόνα 39).

Πίνακας 8: Η συγκέντρωση και ο λόγος καθαρότητας των διαλυμάτων RNA που απομονώθηκαν από τους κλώνους.

Κλώνος	DNA Concentration (ng / μl)	OD₂₆₀ / OD₂₈₀
<i>HeLa</i> wt	602.5	1.89
<i>HeLa</i> -pcDNA	983.68	1.809
FO#2	711.24	1.822
FO#3	702.68	1.810
FO#4	1648.4	1.856
FO#6	211.52	1.852
FO#7	2079.72	1.919
FO#8	1293.32	1.846
FO#9	1779.16	1.952
FO#11	268.24	1.898
FO#12	1697.44	1.946
FO#13	839.22	1.832
FO#15	316.52	1.88
FO#16	532.6	1.824
FO#17	355.72	1.85
FO#18	2409.28	1.962
FO#19	1043.5	1.91
FO#20	1147.28	1.878
FO#21	2091.84	1.934
FO#23	688.4	1.817
FO#24	682.24	1.826



Εικόνα 38: Τμήμα της πλασμιδιακής κατασκευής *FRA10AC1*-pcDNA3.1HisC. Στην εικόνα παρουσιάζονται οι θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR.

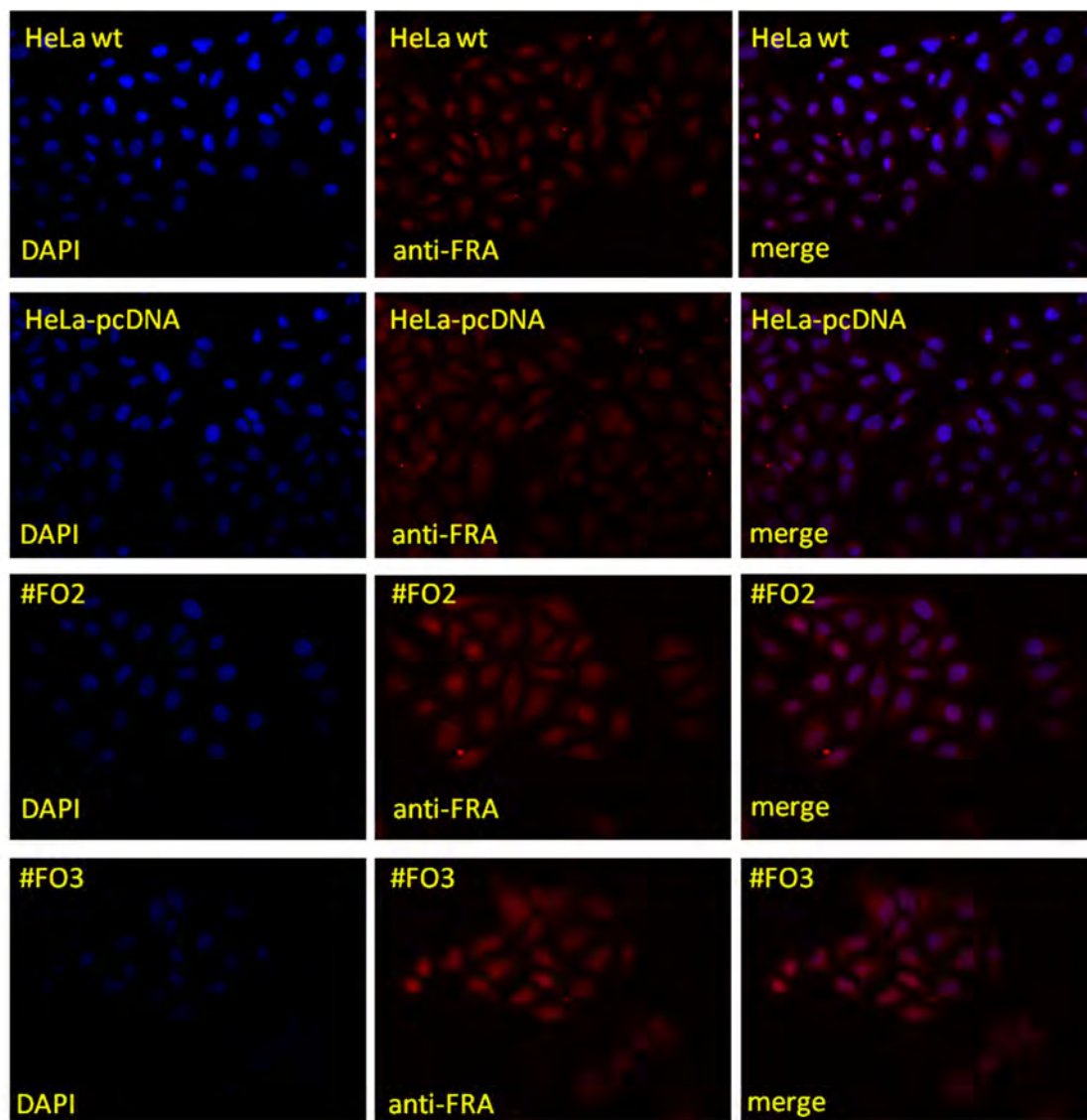


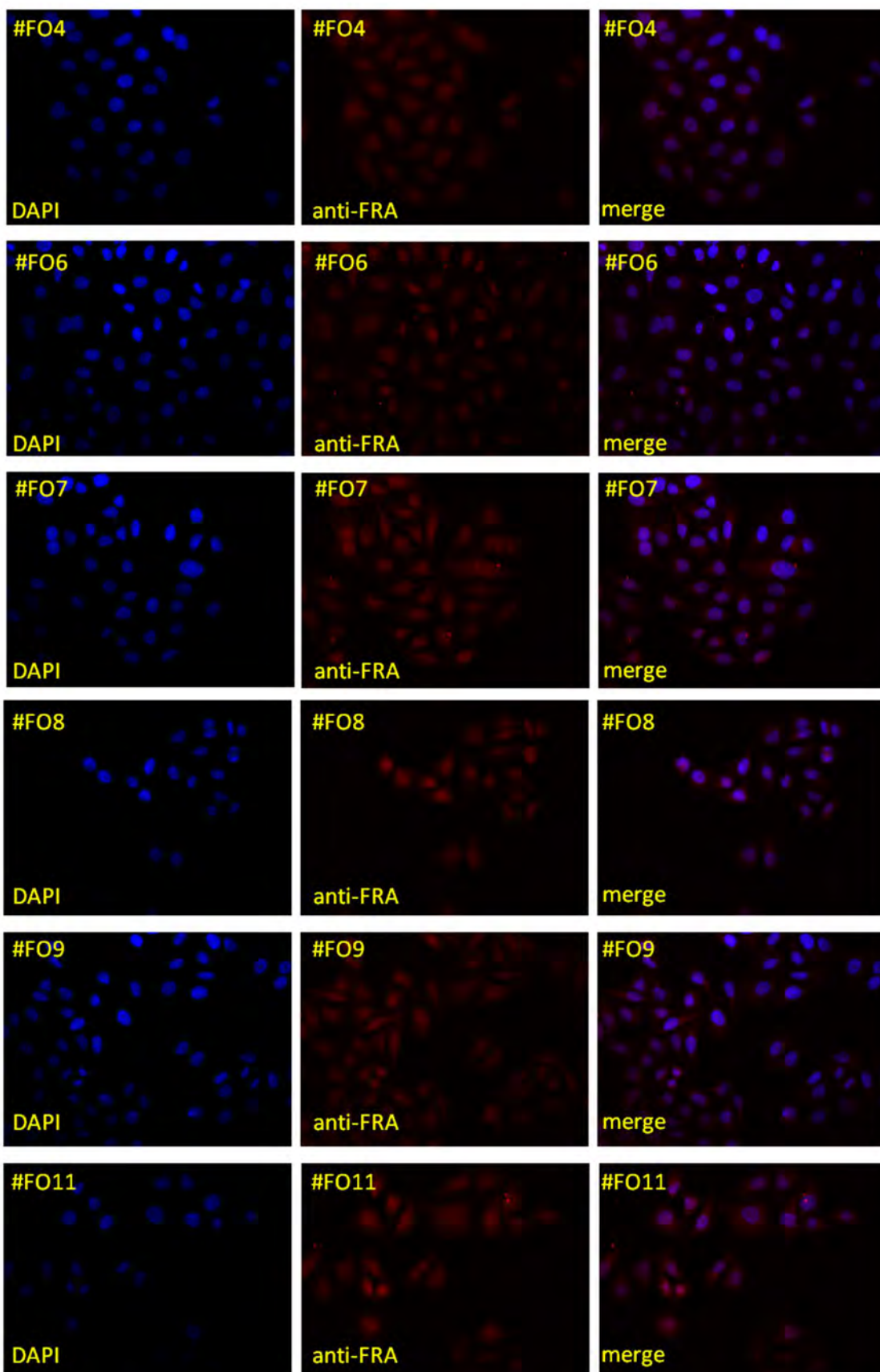
Εικόνα 39: Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων PCR χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών F-Xpress / R1 και F2 / R2. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε cDNA από τους κλώνους FO# και τους κλώνους ελέγχου *HeLa* wt και *HeLa*-pcDNA. Ως αρνητικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκε αντίδραση στην οποία περιέχονταν όλα τα αντιδραστήρια εκτός από δείγμα DNA.

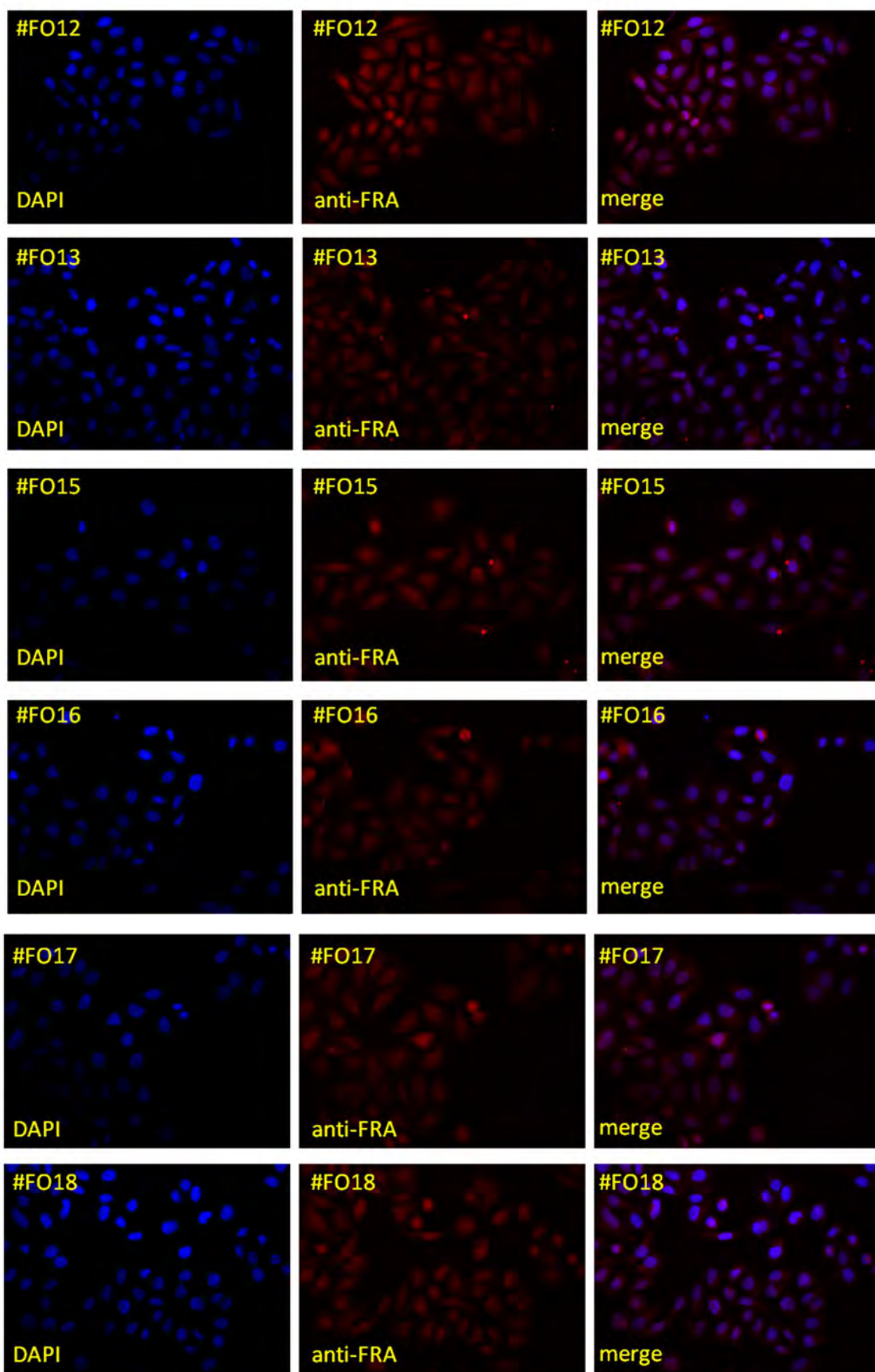
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR με 25 θερμικούς κύκλους, οι κλώνοι FO#3, FO#4, FO#6, FO#9, FO#11, FO#12, FO#15, FO#20, FO#21 και FO#24 παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του πλήρους μήκους διαγονιδίου *FRA10AC1*.

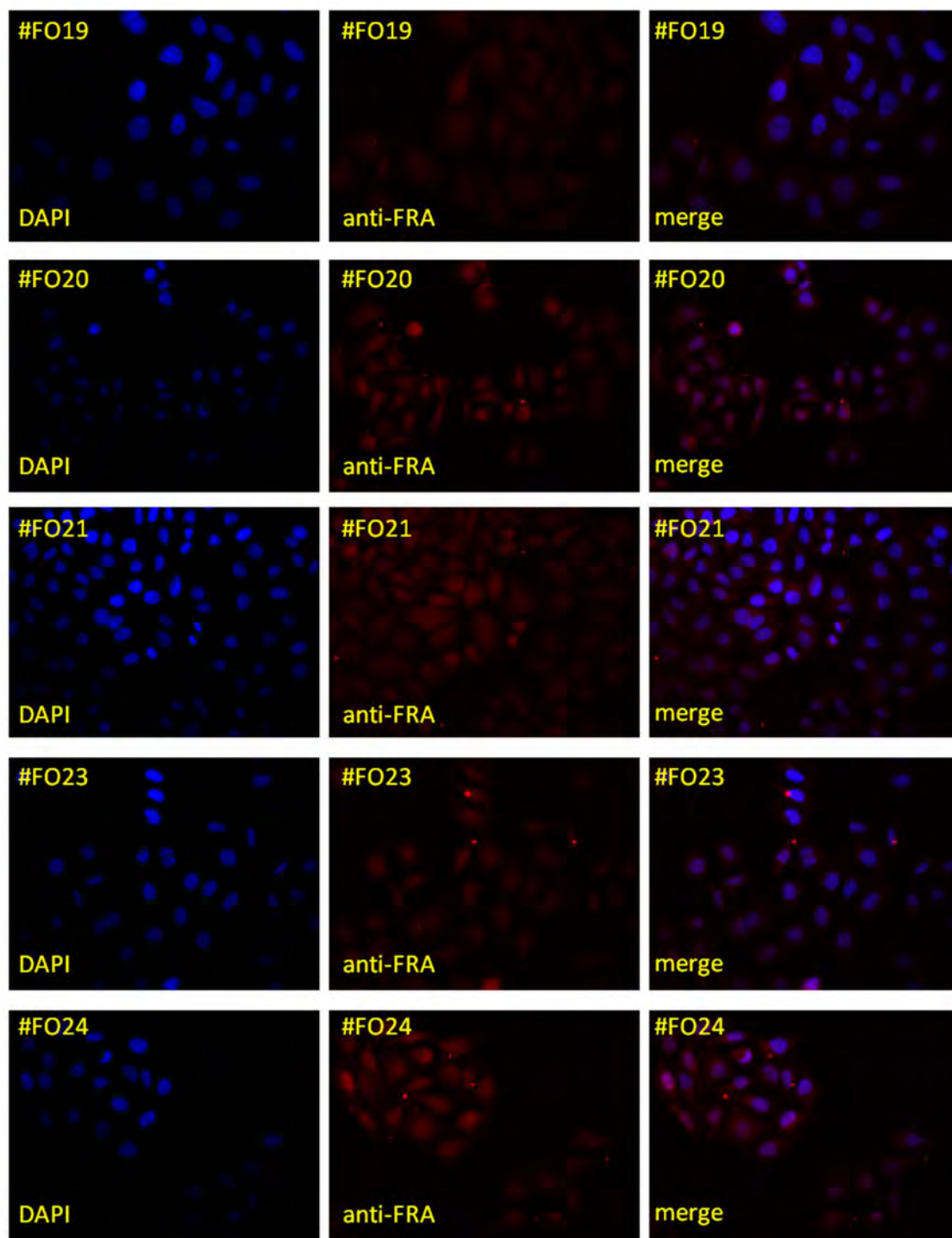
Έλεγχος της έκφρασης της FRA10AC1 στους κλώνους με μικροσκόπιο φθορισμού

Προκειμένου να γίνει εκτίμηση της έκφρασης της FRA10AC1 στους κλώνους που αναπτύχθηκαν, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοεντοπισμού της πρωτεΐνης. Ο φθορισμός που παρατηρείται οφείλεται στη σύνδεση του φθορίζοντος αντισώματος Alexa Fluor 568 Goat Anti-Rabbit στο πρωτογενές αντίσωμα anti-FRA10AC1 που συνδέεται ειδικά στη FRA10AC1. Επομένως, η ένταση του φθορισμού που παρατηρείται είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης FRA10AC1 που υπάρχει στο κύτταρο. Στην Εικόνα 40 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ανοσοεντοπισμού της FRA10AC1.

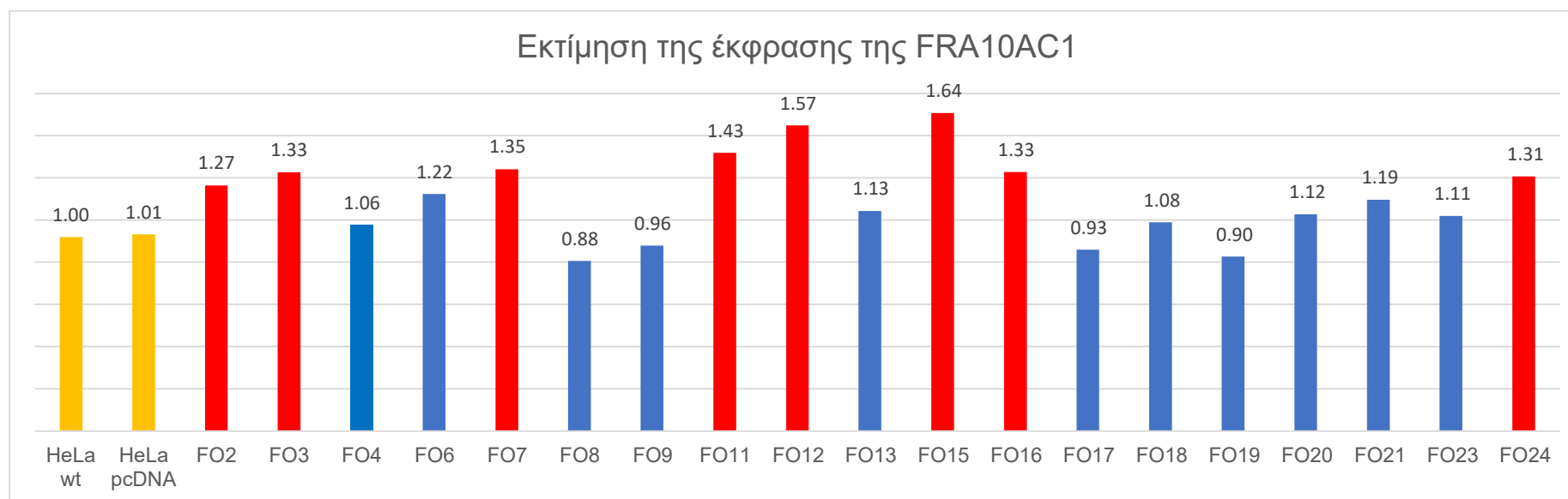








Εικόνα 40: Εικόνες από τον ανοσοεντοπισμό της πρωτεΐνης FRA10AC1 στους κλώνους. Στην πρώτη στήλη παρατηρείται ο φθορισμός του πυρήνα μετά από χρώση με τη φθορίζουσα χρωστική DAPI. Στη μεσαία στήλη με κόκκινο χρώμα διακρίνεται ο φθορισμός της πρωτεΐνης FRA10AC1 στον πυρήνα των κυττάρων, μετά από ανοσοεντοπισμό με ειδικό αντίσωμα. Στην τρίτη παρουσιάζεται η ένωση των δύο εικόνων. Εικόνες από το μικροσκόπιο φθορισμού Nikon Eclipse TE 2000U.



Εικόνα 41: Εκτίμηση της έκφρασης της FRA10AC1 μετά από ανοσοεντοπισμό. Πάνω από τις στήλες παρουσιάζεται η σχετική αφθονία της πρωτεΐνης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου *HeLa* wt. Με κίτρινο σημαίνονται οι μετρήσεις της έντασης φθορισμού σε κύτταρα ελέγχου *HeLa* wt και *HeLa* pcDNA, με κόκκινο οι μετρήσεις των κλώνων που διαφέρουν σημαντικά από τα κύτταρα ελέγχου και με μπλε οι μετρήσεις στους κλώνους που είχαν παρόμοια ένταση φθορισμού με τα κύτταρα ελέγχου. Η μέτρηση της έντασης φθορισμού του πυρήνα έγινε με τη χρήση του λογισμικού Image J.

Σύμφωνα με το πείραμα ανοσοεντοπισμού, οι κλώνοι FO#2, FO#3, FO#7, FO#11, FO#12, FO#15, FO#16 και FO#24 παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση της FRA10AC1, σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου *HeLa* wt και *HeLa*-pcDNA (Εικόνα 41).

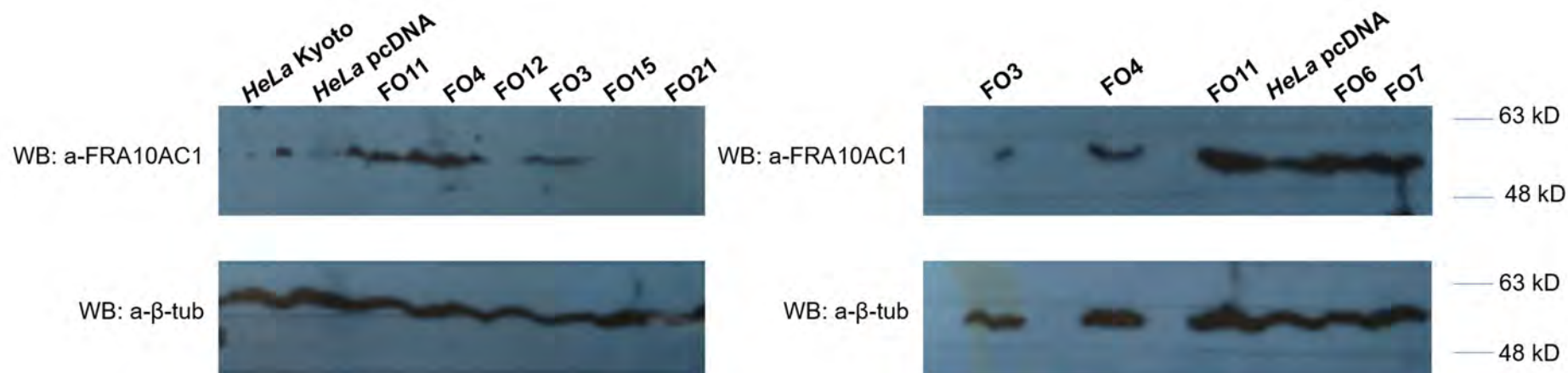
Έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης FRA10AC1 στους κλώνους με ανοσοαποτύπωση (western blot)

Η υπερέκφραση της FRA10AC1 εκτιμήθηκε στη συνέχεια εφαρμόζοντας ανοσοαποτύπωση σε επιλεγμένους κλώνους κυττάρων που είχαν δείξει υπερέκφραση σε επίπεδο mRNA σύμφωνα με τα αποτελέσματα της RT-PCR και σε επίπεδο πρωτεΐνης μέσω του ανοσοεντοπισμού της FRA10AC1. Οι κλώνοι που επιλέχθηκαν για περαιτέρω έλεγχο είναι οι FO#3, FO#4, FO#6, FO#7, FO#11, FO#12, FO#15 και FO#21. Αρχικά έγινε εκχύλιση πρωτεϊνών από τους κλώνους και από κύτταρα ελέγχου *HeLa* wt χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο RIPA. Στον Πίνακα 9 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κλώνων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο Bradford.

Πίνακας 9: Η συγκέντρωση πρωτεϊνών στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κλώνων.

Κλώνος	Συγκέντρωση πρωτεϊνών (μg / μl)
<i>HeLa</i> wt	15.6
<i>HeLa</i> -pcDNA	17.97
FO#3	17.04
FO#4	17.86
FO#6	7.53
FO#7	14
FO#11	16
FO#12	30.89
FO#15	21.3
FO#21	15.8

Στην Εικόνα 42 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης Western των κλώνων FO#3, FO#4, FO#6, FO#7, FO#11, FO#12, FO#15 και FO#21 και των κλώνων ελέγχου *HeLa* Kyoto και *HeLa* pcDNA.



Εικόνα 42: Εικόνες από ανοσοαποτύπωση. Στις πάνω εικόνες παρατηρείται το σήμα που λαμβάνεται με το αντίσωμα a-FRA10AC1 που αναγνωρίζει ειδικά τη FRA10AC1, ενώ στις κάτω το σήμα που λαμβάνεται με το αντίσωμα a-β-tub που αναγνωρίζει ειδικά την τουμπουλίνη β του ανθρώπου.

Από τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης προκύπτει ότι οι κυτταρικοί κλώνοι FO#4, FO#6, FO#7 και FO#11 παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης FRA10AC1 σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου *HeLa* wt και *HeLa* pcDNA.

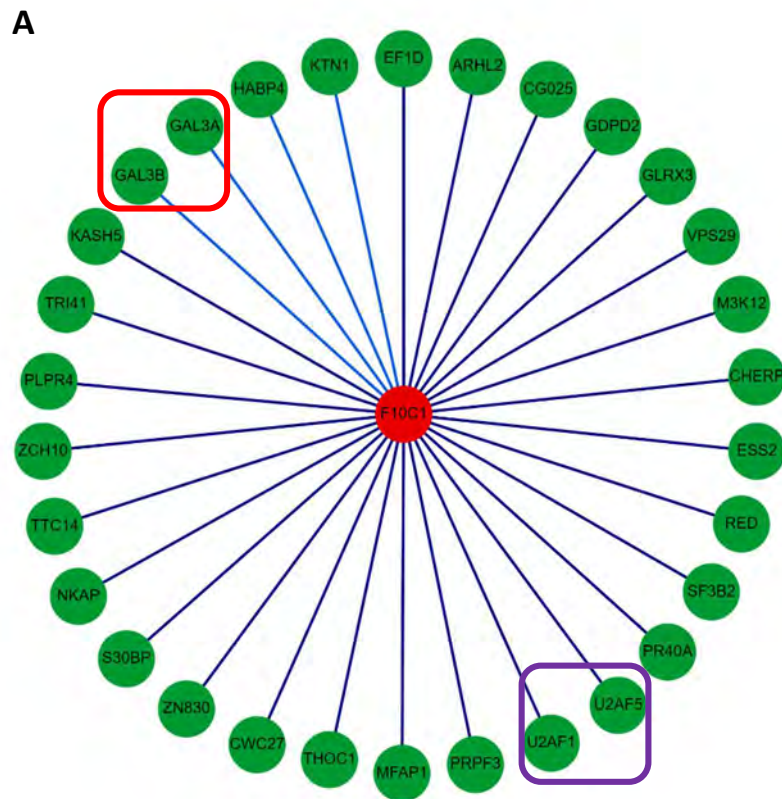
Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης του δικτύου άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1

Επικαιροποίηση του δικτύου άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1

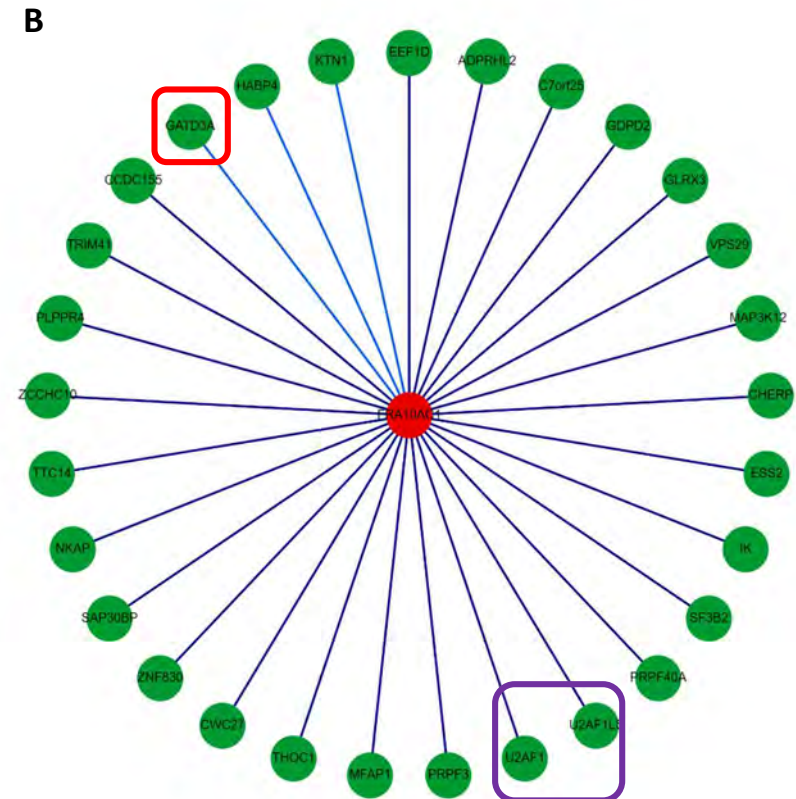
Για τη διερεύνηση του δικτύου άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 πραγματοποιήθηκε αναζήτηση των πρώτων γειτόνων της στη βάση δεδομένων PICKLE 2.5, χρησιμοποιώντας τον όρο FRA10AC1. Η αναζήτηση των πρώτων γειτόνων σε επίπεδο UniProt ID δίνει 31 κόμβους (Εικόνα 43 A), ενώ η αναζήτηση σε επίπεδο Gene ID δείχνει 30 κόμβους (Εικόνα 43 B). Σε επίπεδο πρωτεΐνης παρατηρείται αλληλεπίδραση με μία επιπλέον πρωτεΐνη, την GAL3B, η οποία, σύμφωνα με τη UniProt, στην οποία στηρίζεται η PICKLE, αντιστοιχίζεται στο ίδιο Gene ID με αυτό της GAL3A, αλλά οι βάσεις γονιδιωματικών δεδομένων (όπως η GenBank) της αποδίδουν διαφορετικό Gene ID. Το *U2AF1L5* είναι ένα γονίδιο που παράγει την ίδια πρωτεΐνη με το *U2AF1*, για αυτό και η τελευταία έκδοση της UniProt αποδίδει σε καθένα από τα δύο αυτά γονίδια και τα δύο UniProt IDs (Παράρτημα 1).

Η μεταβάση δεδομένων PICKLE δίνει τη δυνατότητα κατηγοριοποίησης της αξιοπιστίας των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σε υψηλής, μέτριας και χαμηλής ποιότητας αξιοπιστίας, βάσει των πειραματικών διαδικασιών από τις οποίες έχουν προσδιοριστεί. Στο δίκτυο αυτό, οι αλληλεπιδράσεις που παρουσιάζονται με σκούρο μπλε χρώμα είναι αλληλεπιδράσεις υψηλής αξιοπιστίας με βαθμό εμπιστοσύνης 1 (PPI Quality 1), ενώ οι αλληλεπιδράσεις με γαλάζιο χρώμα είναι μέτριας αξιοπιστίας με βαθμό εμπιστοσύνης 2 (PPI Quality 2). Όλες οι αλληλεπιδράσεις συμπεριλαμβάνονται στο ικανοποιητικής αξιοπιστίας (default / cross-checked) δίκτυο της PICKLE.

Σύμφωνα με την PICKLE 2.5 η FRA10AC1 αλληλεπιδρά άμεσα με 30 πρωτεΐνες. Οι 26 αλληλεπιδράσεις είναι υψηλής αξιοπιστίας και προέρχονται από πειράματα συστήματος δύο υβριδίων ή πειράματα συγκατακρήμνισης. Οι αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες GAL3A, GAL3B, HABP4 και KTN1 θεωρούνται μέτριας αξιοπιστίας, αφού έχουν ταυτοποιηθεί από πειράματα συστήματος δύο υβριδίων μεγάλης κλίμακας ή πειράματα συγκρυστάλλωσης (Εικόνα 43). Για να υπάρχει αντιστοιχία μεταξύ των δεδομένων από διάφορες βάσεις δεδομένων και των αναλύσεων που παρουσιάζονται στη συνέχεια χρησιμοποιείται ο αναγνωριστικός κωδικός Gene names (primary) (Παράρτημα 1).



Κόμβοι: 31, Αλληλεπιδράσεις: 30



Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 29

Εικόνα 43: A. Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 σε επίπεδο UniProt ID. B. Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 σε επίπεδο Gene ID. Οι ακμές που έχουν σκούρο μπλε χρώμα υποδεικνύουν αλληλεπιδράσεις υψηλής αξιοπιστίας (PPI Quality 1), ενώ αυτές με γαλάζιο χρώμα αλληλεπιδράσεις μέτριας αξιοπιστίας (PPI Quality 2). Με κόκκινο πλαίσιο σημειώνονται οι GAL3A και GAL3B που το UniProt ID τους αντιστοιχίζεται σε ένα κοινό Gene ID (GATD3A) και έτσι παρουσιάζονται με έναν κόμβο στο δίκτυο σε επίπεδο Gene ID. Με μωβ πλαίσιο σημειώνονται οι U2AF1 και U2AF5 που έχουν ξεχωριστά UniProt IDs, καθένα από τα οποία αντιστοιχίζεται σε δύο Gene IDs, κοινά για τις δύο πρωτεΐνες.

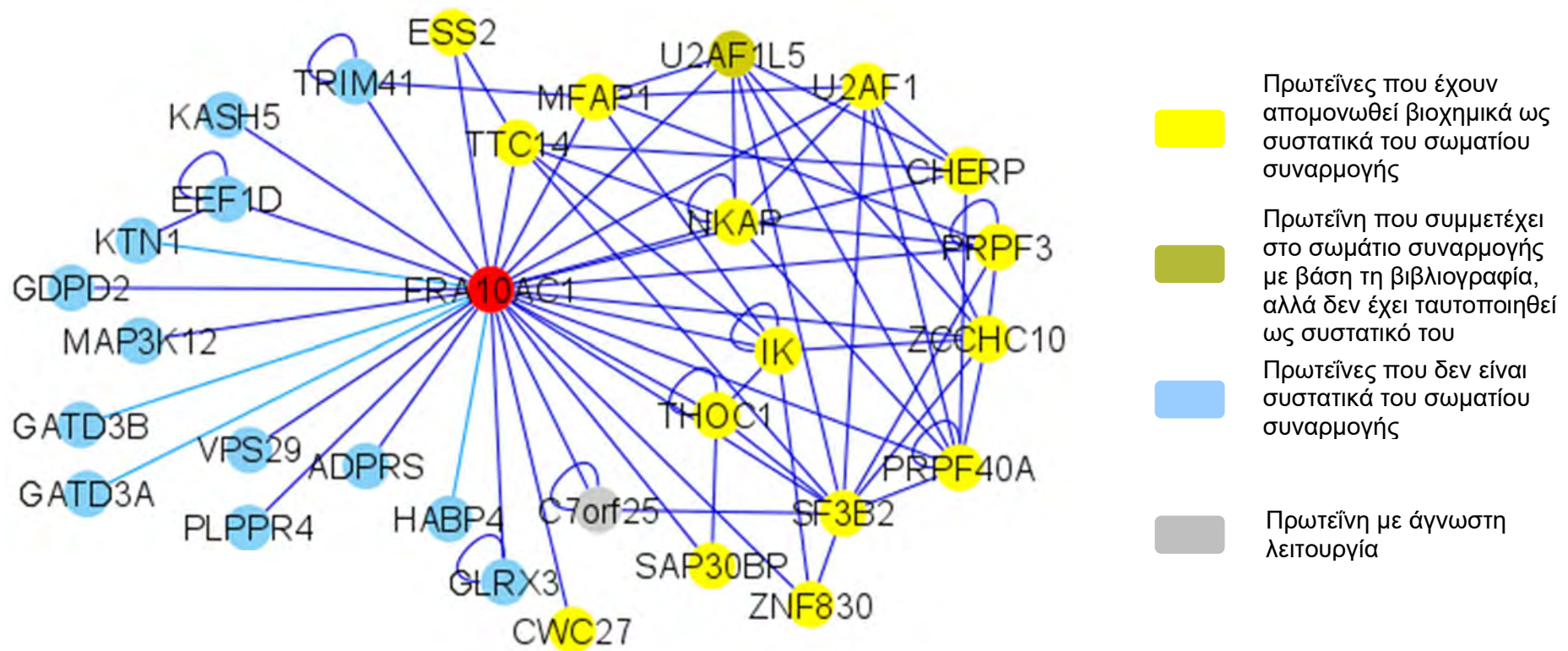
Πίνακας 10: Λειτουργικός χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά άμεσα η FRA10AC1, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων UniProt. Οι πρωτεΐνες με τις οποίες η αλληλεπίδραση της FRA10AC1 είναι αξιοπιστίας 2 σημαίνονται με γκρι χρώμα.

Πρωτεΐνη	Μοριακή λειτουργία / Κυτταρική διεργασία
ADPRS	ριβοζυ-γλυκο-υδρολάση, απόκριση του κυττάρου στο στρες
PLPPR4	λιπιδική φωσφορική φωσφατάση
PRPF3	παράγοντας συναρμογής
PRPF40A	παράγοντας συναρμογής, ρύθμιση του κυτταροσκελετού
TTC14	συστατικό του σωματίου συναρμογής, άγνωστη λειτουργία
CWC27	παράγοντας συναρμογής, πρωτεΐνη δέσμευσης της προλίνης
ZCCHC10	συστατικό του σωματίου συναρμογής, άγνωστη λειτουργία
IK	παράγοντας συναρμογής, ρύθμιση κυτταρικού κύκλου
TRIM41	λιγάση E3
C7orf25	άγνωστη λειτουργία
EEF1D	μεταφορά αμινοακυλ-tRNA στο ριβόσωμα
HABP4	ρύθμιση μεταγραφής, συναρμογής και μετάφρασης, απόκριση του κυττάρου στο στρες
GLRX3	μονοθειόλη γλουταρεδοξίνης, συμμετοχή στο μεταβολισμό του σιδήρου
SF3B2	παράγοντας συναρμογής
MAP3K12	κινάση σερίνης / θρεονίνης, ρύθμιση νευρωνικής διαφοροποίησης
VPS29	συστατικό του συμπλέγματος του ρετρομερούς
KTN1	μεταφορά κυστιδίων μέσω κινεσίνης
MFAP1	παράγοντας συναρμογής
ZNF830	παράγοντας συναρμογής, ρύθμιση κυτταρικού κύκλου
SAP30BP	παράγοντας συναρμογής, μεταγραφικός παράγοντας, επαγωγή κυτταρικού θανάτου
THOC1	συστατικό του σωματίου συναρμογής, έξοδος των mRNAs από τον πυρήνα
CHERP	παράγοντας συναρμογής, ομοιόσταση ασβεστίου, ρύθμιση της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων
KASH5	συστατικό του συμπλέγματος LINC, ρύθμιση κυτταρικού κύκλου
GATD3B	αμινοτρανσφεράση του γλουταμινικού
GATD3A	αμινοτρανσφεράση του γλουταμινικού
U2AF1L5	παράγοντας συναρμογής
U2AF1	παράγοντας συναρμογής
ESS2	παράγοντας συναρμογής
GDPD2	γλυκεροφωσφοϊνοσιτόλη ινοσιτολφωσφοδιεστεράσης, αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης
NKAP	συστατικό του σωματίου συναρμογής, μεταγραφικός παράγοντας

Δεκαέξι από τις πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά άμεσα η FRA10AC1 έχουν ταυτοποιηθεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής. Οι TTC14 και ZZCHC10 έχουν απομονωθεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής, αλλά ο βιοχημικός τους ρόλος παραμένει άγνωστος. Άλλες λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά άμεσα η FRA10AC1 είναι η έξοδος των mRNAs από τον πυρήνα, η ρύθμιση της μεταγραφής και της μετάφρασης, η ρύθμιση του κυτταροσκελετού, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η μεταφορά κυστιδίων και η απόκριση του κυττάρου στο στρες. Για την πρωτεΐνη C7orf25 δεν υπάρχει κανένα διαθέσιμο δεδομένο (Πίνακας 10).

Στην Εικόνα 44 παρουσιάζεται το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1, συμπεριλαμβάνοντας και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρώτων γειτόνων της, σε επίπεδο UniProt ID. Το δίκτυο αποτελείται από 31 κόμβους και 75 αλληλεπιδράσεις.

Παρατηρώντας το δίκτυο φαίνεται πως οι πρωτεΐνες που αποτελούν συστατικά του σωματίου συναρμογής σχηματίζουν ένα επιμέρους πρωτεϊνικό δίκτυο, με εξαίρεση τη CWC27 που συνδέεται με αυτό μόνο μέσω της αλληλεπίδρασης με τη FRA10AC1. Όλες οι πρωτεΐνες που δε συμμετέχουν στη συναρμογή αλληλεπιδρούν μόνο με τη FRA10AC1, με εξαίρεση την TRIM41 που έχει λειτουργία λιγάσης E3 και τη C7orf25 που έχει άγνωστη λειτουργία. Στη συνέχεια παρατίθενται πληροφορίες σχετικά με τις πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά η FRA10AC1.



Κόμβοι: 31, Αλληλεπιδράσεις: 75

Εικόνα 44: Το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1. Το δίκτυο αποτελείται από 31 κόμβους και 75 αλληλεπιδράσεις. Η FRA10AC1 παρουσιάζεται με κόμβο κόκκινου χρώματος. Οι κόμβοι με κίτρινο χρώμα αναπαριστούν πρωτεΐνες που έχουν απομονωθεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής. Με κόμβο λαδί χρώματος παρουσιάζεται η U2AF1L5 η οποία, σύμφωνα με τη UniProt, συμμετέχει στο σωματίο συναρμογής, αλλά δεν έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό του (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Με κόμβο μπλε χρώματος παρουσιάζονται πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε λειτουργίες εκτός του σωματίου συναρμογής. Με κόμβο γκρι χρώματος παρουσιάζεται η C7orf25 που έχει άγνωστη λειτουργία.

ADPRS:

Η πρωτεΐνη ADPRS κωδικοποιείται από το γονίδιο *ADPRHL2* που έχει μήκος 5081 bp και εδράζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 1 του ανθρώπου, στη θέση 1p34.3. Η παραγόμενη πρωτεΐνη, με μήκος 363 aa, ανήκει στην ομάδα των ADP-ριβοζη-γλυκο-υδρολασών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αφαίρεση της πολυ-ADP-ριβοζης από πρωτεΐνες που έχουν υποστεί μετά-μεταφραστική προσθήκη, στα πλαίσια της απόκρισης του κυττάρου σε στρες. Αυτή η διαδικασία αναστροφής αποκαθιστά την κυτταρική ομοιόσταση μετά το στρες (Ghosh, et al., 2018). Η πρωτεΐνη εκφράζεται σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς, εντοπίζεται στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια και αποκρίνεται σε περίπτωση βλάβης στο DNA (Wang, et al., 2018). Ομόζυγη μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας του γονιδίου έχει συσχετιστεί με νευροεκφυλισμό στην παιδική ηλικία που προκαλείται από άγχος με μεταβλητή αταξία και επιληπτικές κρίσεις (Ghosh, et al., 2018).

PLPR4:

Η PLPR4 κωδικοποιείται από το γονίδιο *PLPPR4* που εδράζεται επίσης στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 1 του ανθρώπου στην περιοχή 1p21.3-p21.2 και έχει μήκος 45638 bp. Η πρωτεΐνη PLPR4 που είναι μέλος της οικογένειας των λιπιδικών φωσφορικών φωσφατασών που καταλύουν την αποφωσφορυλίωση ενός αριθμού βιοδραστικών μεσολαβητών, συμπεριλαμβανομένου του λυσοφωσφατιδικού οξέος (LPA), της 1-φωσφορικής σφιγγοσίνης (S1P) και του φωσφατιδικού οξέος (PA) (Sciorra & Morris, 2002). Η PLPR4 έχει μήκος 763 aa και εντοπίζεται αποκλειστικά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Braeuer, et al., 2003). Το γονίδιο είναι κυρίως ενεργό σε βλεννογόνους και σε εγκεφαλικούς ιστούς.

PRPF3:

Η PRPF3 αποτελεί συστατικό του σωματίου συναρμογής και συγκεκριμένα των συμπλόκων U4 και U6 snRNPs. Έχει απομονωθεί ως συστατικό του ολικού σωματίου συναρμογής, καθώς και των επιμέρους συμπλόκων E, A, B, B-act και C (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Το γονίδιο *PRPF3* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 του ανθρώπου στην περιοχή 1q21.2 και έχει μήκος 31,755 bp. Η παραγόμενη πρωτεΐνη έχει μήκος 683 aa, εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων και παρουσιάζει καθολική έκφραση στον άνθρωπο (Martínez-Gimeno, et al., 2003).

PRPF40A:

Η PRPF40A συνδέεται με το σύμπλοκο WASL / N-WASP και παρεμποδίζει τη μετατόπισή του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, αναστέλλοντας έτσι την κυτταροπλασματική λειτουργία του, που είναι η ρύθμιση του πολυμερισμού της ακτίνης (Gaucher, et al., 2012). Επιπλέον, παίζει ρόλο στη ρύθμιση της μορφολογίας των κυττάρων και της κυτταροσκελετικής οργάνωσης, είναι απαραίτητη για τον έλεγχο του σχήματος και της μετανάστευσης των κυττάρων, ενώ παίζει ρόλο και στην κυτταροκίνηση (Bai, et al., 2011). Η PRPF40A έχει απομονωθεί ως συστατικό του σωματίου συναρμογής, καθώς και των επιμέρους συμπλόκων E, A, B και C (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Συγκεκριμένα, έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό του U1 snRNP. Η πρωτεΐνη έχει μήκος 957 aa, εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων, το κυτταρόπλασμα και την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη έχει μήκος 66405 bp, εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 2 του ανθρώπου στην περιοχή 2q23.3 και εκφράζεται καθολικά στους ανθρώπινους ιστούς (Bai, et al., 2011).

TTC14:

Η TTC14 έχει μήκος 770 aa και έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό του καταλυτικού συμπλόκου C του σωματίου συναρμογής, ωστόσο δεν είναι γνωστός ο βιοχημικός της ρόλος (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Το γονίδιο *TTC14* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη έχει μήκος 16218 bp, εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 3 του ανθρώπου, στην περιοχή 3q26.33 και εκφράζεται καθολικά σε όλους τους ιστούς του ανθρώπου.

CWC27:

Το γονίδιο *CWC27* έχει μήκος 249846 bp και εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 5 του ανθρώπου στην περιοχή 5q12.3. Το γονίδιο εκφράζεται σε όλους τους ιστούς του ανθρώπου, με την παραγόμενη πρωτεΐνη να εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Η CWC27 έχει μήκος 472 aa και ανήκει στην οικογένεια των κυκλοφιλινών των πεπτιδυλ-προλυλ cis-trans ισομερασών. Ωστόσο, στερείται καταλυτικής δραστηριότητας και αντί αυτού είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύει την προλίνη (Ulrich & Wahl, 2014). Επιπλέον, έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό του σωματίου συναρμογής και των επιμέρους συμπλόκων B, B-act, C και P (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Οι Xu et al. (2017) εντόπισαν

μεταλλάξεις στο γονίδιο CWC27 σε 10 ασθενείς από 7 μη συγγενείς οικογένειες με αμφιβληστροειδίτιδα με ή χωρίς συνοδές σκελετικές ανωμαλίες.

ZCCHC10:

Η ZCCHC10 έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό των συμπλόκων C και P του σωματίου συναρμογής, ωστόσο ο βιοχημικός της ρόλος παραμένει άγνωστος. Το γονίδιο *ZCCHC10* έχει μήκος 29633 bp και εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 5 του ανθρώπου, στην περιοχή 5q31.1. Η παραγόμενη πρωτεΐνη έχει μήκος 192 aa και παρουσιάζει καθολική έκφραση στον άνθρωπο (Ota, et al., 2004).

IK:

Η IK συμμετέχει στη διαδικασία της συναρμογής ως μέρος του U2 προκαταλυτικού συμπλόκου και έχει απομονωθεί ως συστατικό του ολικού σωματίου και των επιμέρους συμπλόκων A, B, B-act, C και P (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Ωστόσο, δεν αποτελεί κύρια, αλλά βοηθητική πρωτεΐνη της συναρμογής, η οποία συμβάλλει στην επιλογή εναλλακτικών θέσεων συναρμογής σε ένα μικρό σύνολο πρόδρομων mRNAs. Επιπλέον, είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, όπου στρατολογεί τις MAD1L1 και MAD2L1 στον κινητοχώρο (Hu, et al., 2013) και απαιτείται για την ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου της διάταξης της ατράκτου (Yeh, et al., 2012). Η παραγόμενη πρωτεΐνη έχει μήκος 557 aa και εντοπίζεται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Το γονίδιο *IK* έχει μήκος 15423 bp και εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 5 του ανθρώπου, στη θέση 5q31.3. Το γονίδιο είναι μεταγραφικά ενεργό σε όλους τους ιστούς, ενώ είναι και ένα από τα πιο έντονα εκφραζόμενα γονίδια ανάμεσα στους γείτονες της FRA10AC1.

TRIM41:

Το *TRIM41* είναι γονίδιο μήκους 13310 bp, που εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 5 του ανθρώπου στην περιοχή 5q35.3. Το γονίδιο είναι μεταγραφικά ενεργό σε όλους τους ιστούς, ωστόσο παρουσιάζει σημαντικά αυξημένη έκφραση στον ιστό των όρχεων (Chen, et al., 2007). Η TRIM41 έχει μήκος 630 aa και εντοπίζεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα. Η TRIM41 ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών τριμερούς μοτίβου (TRIM) και λειτουργεί ως λιγάση E3 που καταλύει την

προκαλούμενη από ουβικουιτίνη αποδόμηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (Tanaka, et al., 2005).

C7orf25:

Η C7orf25 έχει μήκος 421 aa και εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, ωστόσο είναι άγνωστος ο βιοχημικός της ρόλος. Η πρωτεΐνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *C7orf25*, το οποίο έχει μήκος 3580 bp και εδράζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 7 του ανθρώπου, στην περιοχή 7p14.1 (Huttlin, et al., 2017).

EEF1D:

Τα EF-1-beta και EF-1-delta (EEF1D) διεγείρουν τη μετατροπή του GDP που είναι συνδεδεμένο με το EF-1-alpha σε GTP, αναγεννώντας το EF-1-alpha για να συμμετέχει εκ νέου στη μεταφορά αμινοακυλ-tRNA στο ριβόσωμα. Επιπλέον, μια ισομορφή της πρωτεΐνης ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που ανταποκρίνονται σε θερμικό σοκ. Η EEF1D έχει μήκος 281 aa και εντοπίζεται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Το γονίδιο *EEF1D* έχει μήκος 19845 bp και εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 8 στην περιοχή 8q24.3. Το γονίδιο εκφράζεται σε όλους τους ιστούς του ανθρώπου, αλλά παρουσιάζει σημαντικά υψηλή έκφραση στις ωοθήκες (Kaitsuka, et al., 2011).

HABP4:

Η HABP4 είναι μια πρωτεΐνη με ικανότητα δέσμευσης RNA που παίζει ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής, της συναρμογής και της μετάφρασης (Nery, et al., 2004; Nery, et al., 2006; Bressan, et al., 2009; Goncalves, et al., 2011). Επιπλέον, ρυθμίζει αρνητικά την ικανότητα σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα MEF2C στο DNA, ως απόκριση σε μηχανικό στρες. Η πρωτεΐνη έχει μήκος 413 aa και εντοπίζεται υποκυττάρια στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και σε κυστίδια που σχηματίζονται στο κυτταρόπλασμα υπό συνθήκες στρες. Το *HABP4* έχει μήκος 41182 bp και εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 9 του ανθρώπου, στην περιοχή 9q22.32. Το γονίδιο εκφράζεται σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς, ωστόσο παρουσιάζει σημαντικά αυξημένη έκφραση στον ιστό των όρχεων και τον εγκέφαλο (Bressan, et al., 2009).

GLRX3:

Η GLRX3 ανήκει στην οικογένεια της μονοθειώλης γλουταρεδοξίνης (GRX), μέλη της οποίας χαρακτηρίζονται από το μοτίβο cys-gly-phe-ser που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο των ενζύμων. Οι περισσότερες γλουταρεδοξίνες της μονοθειώλης δεσμεύουν ομάδες 2Fe-2S που δημιουργούνται από 2 μονομερή πρωτεΐνης και 2 μόρια γλουταθειόνης. Η GLRX3 εμπλέκεται στον κυτταρικό μεταβολισμό του σιδήρου και συμμετέχει σε διάφορες οδούς σηματοδότησης των κυττάρων (Haunhorst, et al., 2013). Η πρωτεΐνη έχει μήκος 335 aa και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Το γονίδιο *GLRX3* έχει μήκος 48147 bp, εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 10 του ανθρώπου, στην περιοχή 10q26.3 και είναι μεταγραφικά ενεργό σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς (Stanchi, et al., 2001).

SF3B2:

Η SF3B2 αποτελεί πρωτεΐνη του σωματίου συναρμογής, αφού έχει απομονωθεί ως συστατικό του ολικού σωματίου και όλων των επιμέρους συμπλόκων του (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Η παρουσία της SF3B2 είναι απαραίτητη για τη συγκρότηση του συμπλόκου A που σχηματίζεται από τη σταθερή σύνδεση του U2 snRNP στο σημείο διακλάδωσης του πρόδρομου mRNA και συμμετέχει στη συναρμολόγηση του συμπλόκου E (Das, et al., 2000). Επιπλέον, αποτελεί συστατικό του δευτερεύοντος εξαρτώμενου από το U12 σωματίου συναρμογής, το οποίο εμπλέκεται στη συναρμολόγηση σπάνιων κατηγοριών ιντρονίων πυρηνικών πρόδρομων mRNAs (Will, et al., 2004). Η πρωτεΐνη έχει μήκος 895 aa και εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα των κυττάρων. Το γονίδιο *SF3B2* έχει μήκος 18580 bp και εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 11 του ανθρώπου, στην περιοχή 11q13.1 (Cretu, et al., 2016). Το *SF3B2* είναι ενεργό σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς, ενώ αποτελεί ένα από τα υψηλότερα εκφραζόμενα γονίδια που ανήκουν στους πρώτους γείτονες της FRA10AC1.

MAP3K12:

Η MAP3K12 αποτελεί μέλος της οικογένειας πρωτεϊνικών κινασών σερίνης / θρεονίνης. Οι κινάσες αυτές περιέχουν μια περιοχή φερμουάρ λευκίνης και εκφράζονται κυρίως σε νευρωνικά κύτταρα. Η κατάσταση φωσφορυλίωσης αυτής της κινάσης σε συναπτικούς νευρώνες δείχνει ότι ρυθμίζεται με αποπόλωση της μεμβράνης μέσω καλσινευρίνης. Η MAP3K12 σχηματίζει ετεροδιμερή με φερμουάρ λευκίνης που

φέρουν παράγοντες μεταγραφής και παίζει ρυθμιστικό ρόλο στη νευρωνική διαφοροποίηση που προκαλείται από ρετινοϊκό οξύ (Reddy & Pleasure, 1994). Η πρωτεΐνη έχει μήκος 859 aa και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων. Το *MAP3K12* έχει μήκος 20468 bp και εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 12 του ανθρώπου, στην περιοχή 12q13.13. Το γονίδιο εκφράζεται σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς, ωστόσο τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στον εγκέφαλο και σε νευρικά κύτταρα (Reddy & Pleasure, 1994).

VPS29:

Η VPS29 λειτουργεί ως συστατικό του συμπλέγματος ρετρομερούς. Το ρετρομερές είναι ένα σύμπλοκο κάλυψης κυστιδίων που αποτρέπει τη λυσοσωμική αποικοδόμηση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που μεταφέρονται με κυστίδια (Seaman, et al., 2009). Η πρωτεΐνη έχει μήκος 182 aa και εντοπίζεται υποκυττάρια στο κυτταρόπλασμα και στα ενδοσώματα. Το γονίδιο *VPS29* έχει μήκος 11060 bp, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12 του ανθρώπου στην περιοχή 12q24.11 και παρουσιάζει καθολική έκφραση στον άνθρωπο (Damen, et al., 2006).

KTN1:

Η KTN1 λειτουργεί ως υποδοχέας κινεσίνης και εμπλέκεται έτσι στη μεταφορά κυστιδίων μέσω της κινεσίνης. Επίσης, συσσωρεύεται σε σύμπλοκα προσκόλλησης της ιντεγκρίνης κατά τη συσσωμάτωσή της από την ινονεκτίνη. Η πρωτεΐνη έχει μήκος 1357 aa και εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το γονίδιο *KTN1* που την κωδικοποιεί έχει μήκος 142455 bp και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14 του ανθρώπου, στην περιοχή 14q22.1. Το γονίδιο εκφράζεται καθολικά, παρουσιάζοντας υψηλά επίπεδα έκφρασης στους όρχεις, τους μυς και τις αρτηρίες (Rao, et al., 1997).

MFAP1:

Η MFAP1 συμμετέχει στη συναρμολόγηση των πρόδρομων mRNAs ως συστατικό του σωματίου συναρμογής. Συγκεκριμένα, έχει απομονωθεί ως συστατικό του ολικού σωματίου συναρμογής και των επιμέρους συμπλόκων A, B, B-act, C και P (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Η MFAP1 έχει μήκος 439 aa και εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Το γονίδιο *MFAP1* έχει μήκος 20262 bp,

εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 15 στην περιοχή 15q15.3 και εκφράζεται σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς (Yeh, et al., 1994).

ZNF830:

Η ZNF830 αποτελεί συστατικό του σωματίου συναρμογής και συγκεκριμένα των συμπλόκων B, B-act, C και P (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Επιπλέον, παίζει ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, συμμετέχοντας στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος. Κατά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες συμβάλλει στη διατήρηση της σταθερότητας της διχάλας αντιγραφής, αποτρέπει τη δημιουργία δίκλωνων θραύσεων και συμμετέχει στην ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου S / G2 του κυτταρικού κύκλου (De, et al., 2015). Η πρωτεΐνη έχει μήκος 372 aa και εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί έχει μήκος 2248 bp, εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 17 του ανθρώπου, στην περιοχή 17q12 και εκφράζεται σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς (Ota, et al., 2004).

SAP30BP:

Η SAP30BP είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη μήκους 308 aa, η οποία λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας καταστολής της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την επιβίωση των κυττάρων, επάγοντας τον κυτταρικό θάνατο (Li, et al., 2004). Το γονίδιο *SAP30BP* έχει μήκος 40947 bp, εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 17 στην περιοχή 17q25.1 και εκφράζεται καθολικά στον άνθρωπο (Ota, et al., 2004).

THOC1:

Η πρωτεΐνη THOC1 είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική εξαγωγή των πολυαδενυλιωμένων mRNAs από τον πυρήνα. Συγκεκριμένα, δρα ως συστατικό του υποσυμπλέγματος THO του συμπλέγματος TREX που συμμετέχει στη μεταγραφή, την επεξεργασία και την εξαγωγή των mRNAs από τον πυρήνα (Song, et al., 2013). Η THOC1 έχει απομονωθεί ως συστατικό του ολικού σωματίου συναρμογής και των επιμέρους συμπλόκων B, Bact και C (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Επιπλέον, συμμετέχει σε μια αποπτωτική οδό που χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση της κασπάσης-6, αυξάνει την έκφραση των *BAK1* και *BCL2L1* και ενεργοποιεί τον NF-kappa-B. Η πρωτεΐνη THOC1 έχει μήκος 657 aa και εντοπίζεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Το γονίδιο *THOC1* που την κωδικοποιεί έχει μήκος

53540 bp και εντοπίζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 18 στην περιοχή 18p11.32 που βρίσκεται κοντά στο τελομερές. Το γονίδιο είναι μεταγραφικά ενεργό σε όλους τους ιστούς του ανθρώπου (Song, et al., 2013).

CHERP:

Η πρωτεΐνη CHERP συμμετέχει στην ομοιόσταση του ασβεστίου, στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επιπλέον, έχει απομονωθεί ως συστατικό του σωματίου συναρμογής και των συμπλόκων A, B, C και P (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Η πρωτεΐνη έχει μήκος 916 aa και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων. Το γονίδιο *CHERP* έχει μήκος 24564 bp και εντοπίζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 19 του ανθρώπου, στην περιοχή 19p13.11. Το γονίδιο εκφράζεται σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς (Laplante, et al., 2000).

KASH5:

Η πρωτεΐνη KASH5 αποτελεί συστατικό του συμπλέγματος LINC που εμπλέκεται στη σύνδεση μεταξύ του πυρηνικού ελάσματος και του κυτταροσκελετού. Οι πυρηνοκυτταροπλασματικές αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται από το σύμπλεγμα LINC παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση των μηχανικών δυνάμεων μέσω του πυρηνικού φακέλου και στην κίνηση και τοποθέτηση του πυρήνα. Επιπλέον, συμμετέχει στον κυτταρικό κύκλο, αφού είναι απαραίτητη για τη σύζευξη των ομολόγων χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μειωτικής πρόφασης στα σπερματοκύτταρα και πιθανώς και στα ωοκύτταρα. Η πρωτεΐνη έχει μήκος 562 aa και εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Το γονίδιο *CCDC155* που την κωδικοποιεί έχει μήκος 29782 bp και εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 19 στην περιοχή 19q13.33 (Ota, et al., 2004). Το γονίδιο παρουσιάζει υψηλή ιστοειδικότητα, αφού εκφράζεται μόνο σε μεγάλο βαθμό στον ιστό των όρχεων και σε μικρότερο βαθμό στην παρεγκεφαλίδα.

GAL3A και GAL3B:

Οι πρωτεΐνες GAL3A και GAL3B λειτουργούν ως αμινοτρασφεράσες του γλουταμινικού. Το γονίδιο *GATD3A* που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της GAL3A έχει μήκος 76505 bp και εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 21 του ανθρώπου στην περιοχή 21q22.3. Η GAL3B κωδικοποιείται από το γονίδιο

GATD3B που εδράζεται στο μικρό βραχίονα του ίδιου χρωμοσώματος, στην περιοχή 21p12 και έχει μήκος 49158 bp. Οι πρωτεΐνες που παράγονται από τα δύο γονίδια εντοπίζονται στο μιτοχόνδριο, έχουν μήκος 268 aa και διαφέρουν στο έκτο αμινοξύ (GAL3A: V, GAL3B: A). Το *GATD3B* παρουσιάζει χαμηλή, αλλά σταθερή έκφραση, σε όλους τους ιστούς, ενώ το *GATD3A* εκφράζεται μόνο στη σάλπιγγα και στην ουροδόχο κύστη (Hattori, et al., 2000).

U2AF1L5 και U2AF1:

Το γονίδιο *U2AF1* έχει μήκος 14632 bp και εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 21 στην περιοχή 21q22.3. Το γονίδιο *U2AF1L5* έχει μήκος 14662 και εντοπίζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 21 στην περιοχή 21p12 (Hattori, et al., 2000). Το γονίδιο *U2AF1L5* παράγει την ίδια πρωτεΐνη με το *U2AF1*, η οποία έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό του σωματίου συναρμογής συμμετέχοντας στα σύμπλοκα E, A, B και B-act (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Η πρωτεΐνη έχει μήκος 240 aa, εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων και ρόλος της είναι η αναγνώριση της 3' θέσης συναρμογής.

ESS2:

Η ESS2 έχει μήκος 476 aa, εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων και αποτελεί συστατικό του σωματίου συναρμογής, καθώς έχει απομονωθεί ως συστατικό του ολικού σωματίου και των επιμέρους συμπλόκων B-act, C, και P (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Το γονίδιο *ESS2* έχει μήκος 14448 bp και εδράζεται στο χρωμόσωμα 22 στην περιοχή 22q11.21, εντός της περιοχής που έχει θεωρηθεί υπεύθυνη για την εμφάνιση του συνδρόμου μικροελλείμματος 22q11.2, χωρίς να έχει συνδεθεί άμεσα το ίδιο με την εμφάνιση του συνδρόμου. Τα συνήθη συμπτώματα που εμφανίζονται στους ασθενείς περιλαμβάνουν συγγενή καρδιακά προβλήματα, συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του προσώπου, εμφάνιση συχνών λοιμώξεων, αναπτυξιακή καθυστέρηση και μαθησιακά προβλήματα (McDonald-McGinn, et al., 2015). Το γονίδιο παρουσιάζει καθολική έκφραση στον άνθρωπο, με σημαντικότερη έκφραση στον ιστό των όρχεων.

GDPD2:

Η πρωτεΐνη GDPD2 έχει δραστικότητα γλυκεροφωσφοϊνοσιτόλης ινοσιτολφωσφοδιεστεράσης και συγκεκριμένα υδρολύει γλυκεροφωσφοϊνοσιτόλη.

Επιπλέον, παίζει ρόλο στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Η πρωτεΐνη έχει μήκος 539 aa και εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Το γονίδιο *GDPD2* έχει μήκος 10361 bp και εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος X στην περιοχή Xq13.1. Το *GDPD2* παρουσιάζει υψηλή μεταγραφική ενεργότητα στο σπλήνα και σε μικρότερο βαθμό στο δέρμα (Ota, et al., 2004). Η πρωτεΐνη έχει μήκος 415 aa και εντοπίζεται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων.

NKAP:

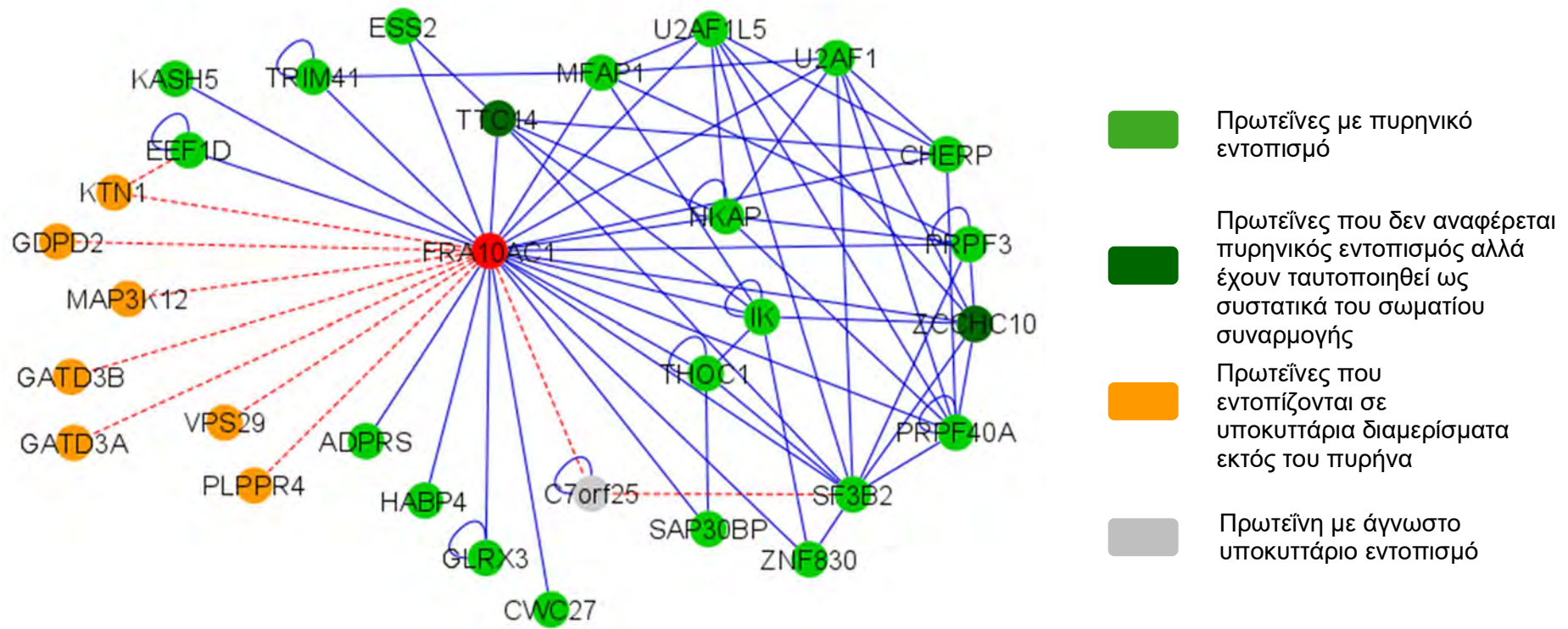
Η πρωτεΐνη NKAP δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και καταστέλλει τη σηματοδοτούμενη από το Notch σηματοδότηση που απαιτείται για την ανάπτυξη των T-κυττάρων (Pajerowski, et al., 2009). Επίσης, εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του TNF και της IL-1 που ενεργοποιούν το NF-kappa-B (Chen, et al., 2003). Η NKAP έχει απομονωθεί ως συστατικό των συμπλόκων C και P του σωματίου συναρμογής (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Το γονίδιο *NKAP* έχει μήκος 23101 bp και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα X στην περιοχή Xq24. Το γονίδιο είναι μεταγραφικά ενεργό σε όλους τους ιστούς του ανθρώπου (Gerhard, et al., 2004).

Ανακατασκευή του επιμέρους δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 στον πυρήνα

Η πρωτεΐνη FRA10AC1 εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων, επομένως θα ήταν λογικό να αλληλεπιδρά μόνο με πρωτεΐνες που βρίσκονται επίσης στον πυρήνα. Ωστόσο, διερευνώντας τον υποκυττάριο εντοπισμό των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά παρατηρείται ότι οι KTN1, GDPD2, MAP3K12, GATD3B, GATD3A, VPS29 και PLPPR4 εντοπίζονται σε άλλα υποκυττάρια διαμερίσματα εκτός του πυρήνα (Πίνακας 11). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και σε άλλες αλληλεπιδράσεις του δικτύου, όπου αλληλεπιδρούν πρωτεΐνες που δε βρίσκονται σε κοινά υποκυττάρια διαμερίσματα. Έτσι, ανακατασκευάστηκε το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 σημαίνοντας με κόκκινες διακεκομμένες γραμμές τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών που δεν εντοπίζονται σε κοινά υποκυττάρια διαμερίσματα (Εικόνα 45 Α). Για τις πρωτεΐνες TTC14, ZCCHC10 και CHERP δεν αναφέρεται υποκυττάριος εντοπισμός στον πυρήνα, αλλά θεωρείται δεδομένος καθότι έχουν ταυτοποιηθεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018) που βρίσκεται στον πυρήνα.

Πίνακας 11: Ο υποκυττάριος εντοπισμός των μελών του δικτύου της FRA10AC1.

Πρωτεΐνη	Υποκυττάριος εντοπισμός
FRA10AC1	πυρήνας
ADPRS	πυρήνας, κυτταρόπλασμα, μιτοχόνδριο
PLPPR4	κυτταρική μεμβράνη
PRPF3	πυρήνας, κυτταρόπλασμα
PRPF40A	πυρήνας, κυτταρόπλασμα, κυτταρική μεμβράνη
TTC14	δεν αναφέρεται
CWC27	πυρήνας
ZCCHC10	δεν αναφέρεται
IK	πυρήνας, κυτταρόπλασμα
TRIM41	πυρήνας, κυτταρόπλασμα
C7orf25	δεν αναφέρεται
EEF1D	πυρήνας, κυτταρόπλασμα
HABP4	πυρήνας, κυτταρόπλασμα, σύμπλεγμα Golgi
GLRX3	πυρήνας, κυτταρόπλασμα
SF3B2	πυρήνας
MAP3K12	κυτταρόπλασμα, κυτταρική μεμβράνη
VPS29	κυτταρόπλασμα, ενδοσώματα
KTN1	κυτταρική μεμβράνη, ενδοπλασματικό δίκτυο
MFAP1	πυρήνας
ZNF830	πυρήνας
SAP30BP	πυρήνας
THOC1	πυρήνας, κυτταρόπλασμα
CHERP	πυρήνας, κυτταρόπλασμα, κυτταρική μεμβράνη, ενδοπλασματικό δίκτυο
KASH5	πυρήνας, κυτταρική μεμβράνη
GATD3B	μιτοχόνδριο
GATD3A	μιτοχόνδριο
U2AF1L5	πυρήνας
U2AF1	πυρήνας
ESS2	πυρήνας
GDPD2	κυτταρόπλασμα, κυτταρική μεμβράνη
NKAP	πυρήνας, κυτταρόπλασμα



Κόμβοι: 31, Αλληλεπιδράσεις: 75

Εικόνα 45: Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1. Η FRA10AC1 παρουσιάζεται με κόκκινο κόμβο. Με πράσινο κόμβο παρουσιάζονται πρωτεΐνες που εντοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου. Με σκούρο πράσινο κόμβο παρουσιάζονται πρωτεΐνες για τις οποίες δεν αναφέρεται ο υποκυττάριος εντοπισμός τους, αλλά έχουν ταυτοποιηθεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής που βρίσκεται στον πυρήνα. Με πορτοκαλί κόμβο παρουσιάζονται πρωτεΐνες που δεν εντοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου. Με γκρι κόμβο παρουσιάζεται η C7orf25 για την οποία δεν υπάρχουν πληροφορίες για τον υποκυττάριο εντοπισμό της. Με κόκκινες διακεκομμένες ακμές σημαίνονται οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε πρωτεΐνες που εντοπίζονται σε διαφορετικά υποκυττάρια διαμερίσματα.

Σύμφωνα με τον υποκυττάριο εντοπισμό των πρωτεϊνών, οι αλληλεπιδράσεις της FRA10AC1 με τις GATD3A, GATD3B, PLPPR4, VPS29, GDPD2, MAP3K12 και KTN1 και της EEF1D με την KTN1 δεν μπορούν να συμβούν σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο, αφού οι πρωτεΐνες αυτές δεν εντοπίζονται στα ίδια υποκυττάρια διαμερίσματα. Τα πειράματα που έδειξαν αυτές τις αλληλεπιδράσεις μπορεί να υποδεικνύουν τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης των δύο μορίων αν αυτά έρθουν σε επαφή, αλλά να μην αλληλεπιδρούν στην πραγματικότητα στα κύτταρα, λόγω του εντοπισμού τους σε διαφορετικά υποκυττάρια διαμερίσματα. Από την άλλη, οι πρωτεΐνες μπορεί να έρχονται σε επαφή σε χρονικές περιόδους που χάνεται ο πυρήνας του κυττάρου, όπως συμβαίνει κατά τη μίτωση. Επιπλέον, είναι πιθανό πολύ μικρές ποσότητες των πρωτεϊνών να βρίσκονται και σε άλλα υποκυττάρια διαμερίσματα, εκτός από αυτά που έχουν ταυτοποιηθεί, αλλά λόγω της μικρής συγκέντρωσής τους να μην είναι ανιχνεύσιμες σε αυτά.

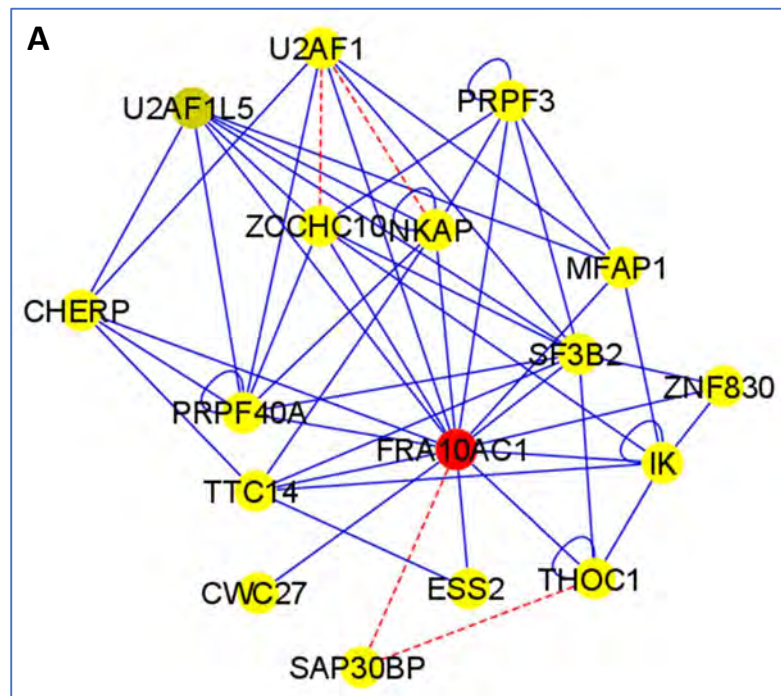
Ανακατασκευή των επιμέρους δικτύων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 στο σωματίο συναρμογής

Η FRA10AC1 έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό του σωματίου συναρμογής και συγκεκριμένα των υποσυμπλόκων B-act, C και P και αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι αλληλεπιδρά με 16 πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη συναρμογή (Εικόνα 46 Α). Είναι γνωστό ότι τα επιμέρους σύμπλοκα δεν αποτελούνται από τις ίδιες πρωτεΐνες και έτσι ελέγχθηκε η συμμετοχή των πρώτων γειτόνων της FRA10AC1 στα διάφορα σύμπλοκα (Πίνακας 12) και έπειτα ανακατασκευάστηκε το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 σε κάθε επιμέρους σύμπλοκο (Εικόνες 46 Β, Γ, Δ). Η U2AF1L5 δε συμπεριλαμβάνεται στη λίστα των πρωτεϊνών που έχουν ταυτοποιηθεί ως συστατικά των επιμέρους συμπλόκων του σωματίου συναρμογής (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018), ωστόσο μετά από αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων GeneCards (Stelzer et al., 2016) και Kegg (Kanehisa, 2019) βρέθηκε ότι αποτελεί συστατικό των συμπλόκων Α, Β και C.

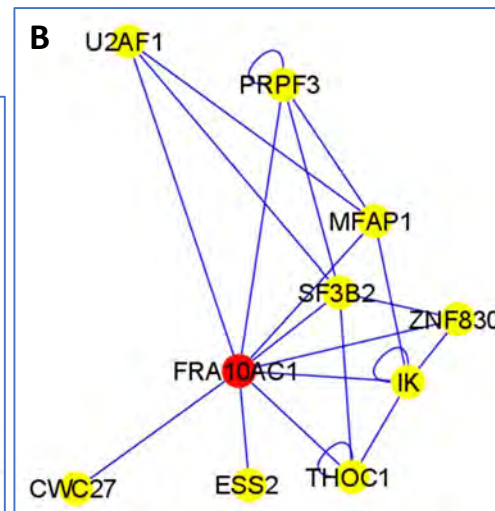
Πίνακας 12: Η συμμετοχή των μελών του δικτύου της FRA10AC1 στα επιμέρους σύμπλοκα του σωματίου συναρμογής.

Πρωτεΐνη	Επιμέρους σύμπλοκα					
	E	A	B	B-act	C	P
FRA10AC1						
PRPF3						
PRPF40A						
TTC14						
CWC27						
ZCCHC10						
IK						
SF3B2						
MFAP1						
ZNF830						
SAP30BP						
THOC1						
CHERP						
U2AF1L5*						
U2AF1						
ESS2						
NKAP						

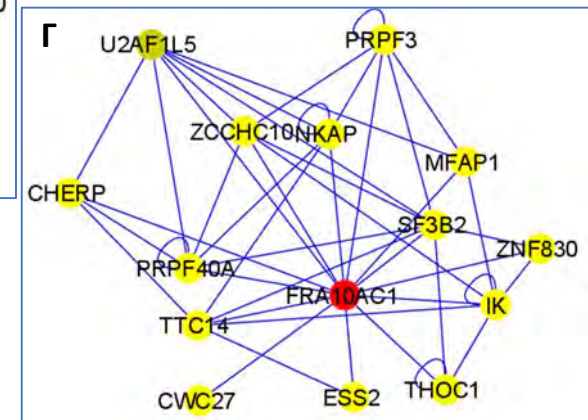
*Σύμφωνα με πληροφορίες από τις βάσεις δεδομένων GeneCards και Kegg.



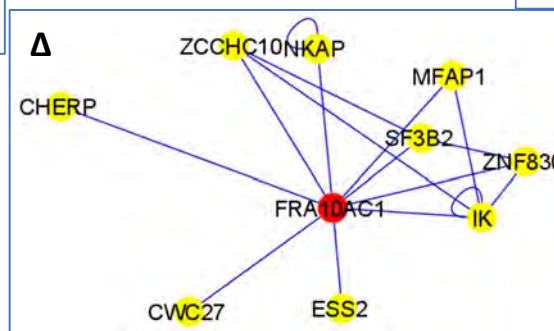
Κόμβοι: 17, Αλληλεπιδράσεις: 54



Κόμβοι: 10, Αλληλεπιδράσεις: 21



Κόμβοι: 15, Αλληλεπιδράσεις: 50



Κόμβοι: 10, Αλληλεπιδράσεις: 16

Εικόνα 46: Α. Το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με πρωτεΐνες του σωματίου συναρμογής. Β. Το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σύμπλοκο B-act του σωματίου συναρμογής. Γ. Το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σύμπλοκο C του σωματίου συναρμογής. Δ. Το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σύμπλοκο P του σωματίου συναρμογής. Η FRA10AC1 παρουσιάζεται με κόκκινο κόμβο. Με κίτρινο κόμβο παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες που έχουν ταυτοποιηθεί ως συστατικά των επιμέρους συμπλόκων του σωματίου συναρμογής (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Με λαδί κόμβο παρουσιάζεται η U2AF1L5 που αναφέρεται ως συστατικό του σωματίου συναρμογής, αλλά δεν έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό του. Με κόκκινη διακεκομμένη γραμμή σημαίνονται οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα με πρωτεΐνες που δε συναντώνται σε κοινά επιμέρους σύμπλοκα.

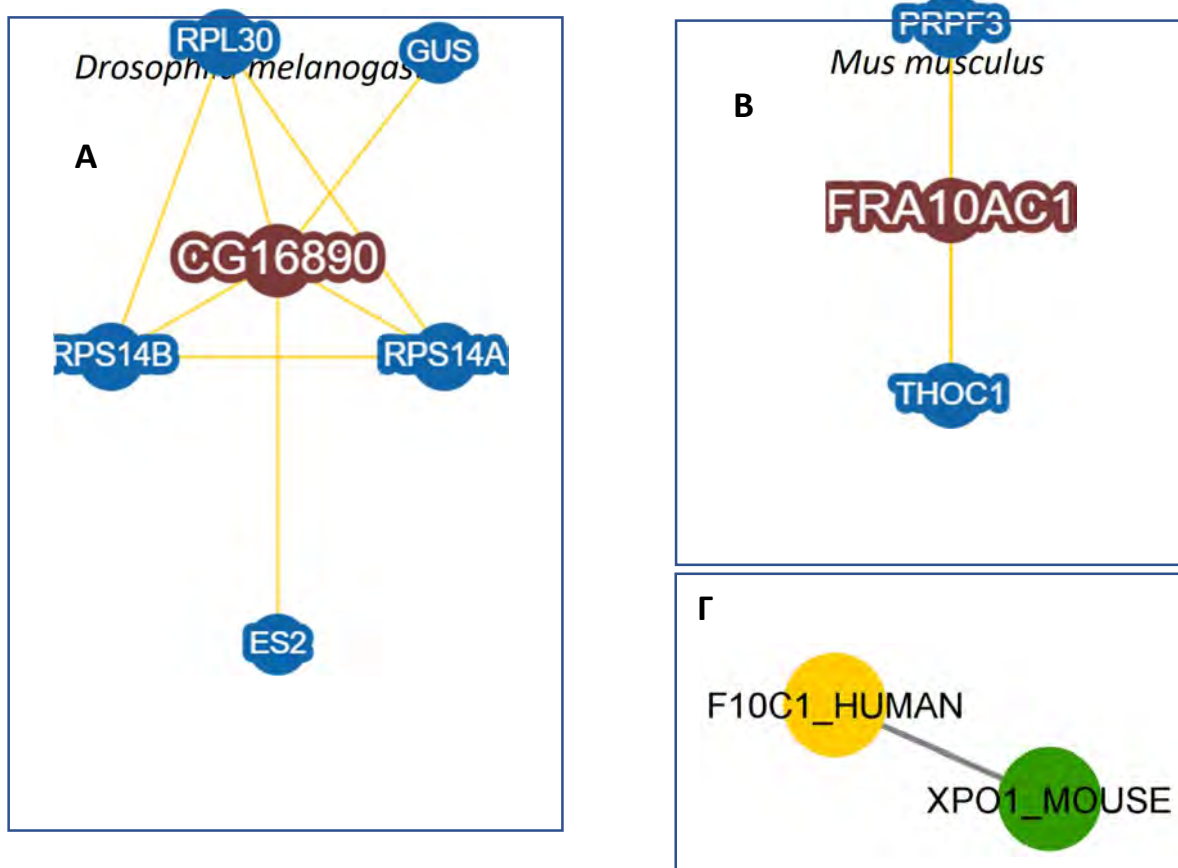
Σύμφωνα με την Εικόνα 46 Α τα ζεύγη πρωτεϊνών SAP30BP-FRA10AC1, SAP30BP-THOC1, U2AF1-NKAP και U2AF1-ZCCHC10 δεν εντοπίζονται σε κοινά σύμπλοκα του σωματίου συναρμογής. Η εύρεση αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε αυτές τις πρωτεΐνες μπορεί να οφείλεται στον πειραματικό σχεδιασμό της μεθόδου που ταυτοποίησε τις αλληλεπιδράσεις, μπορεί οι πρωτεΐνες να αλληλεπιδρούν στα πλαίσια μιας άλλης διεργασίας εκτός του σωματίου συναρμογής ή ενδέχεται να μην έχουν βρεθεί στις συγκεκριμένες μελέτες απομόνωσης των συστατικών των επιμέρους συμπλόκων του σωματίου συναρμογής, λόγω μικρής συγκέντρωσης των εμπλεκόμενων πρωτεϊνών.

Διεύρυνση του δικτύου της FRA10AC1 με δεδομένα από ορθόλογες πρωτεΐνες

Για τη διεύρυνση του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 πραγματοποιήθηκε αναζήτηση των ορθόλογων πρωτεϊνών σε άλλα είδη. Συνολικά εντοπίστηκαν 760 ορθόλογες πρωτεΐνες σε 328 είδη (Παράρτημα 2), με τις πρωτεΐνες των 107 ειδών να έχουν προβλεφθεί βάσει των μεταγράφων που εντοπίστηκαν. Στα διάφορα είδη έχουν εντοπιστεί από 1 (99 είδη) έως και 12 ισομορφές της FRA10AC1 (*Microcebus murinus*).

Στη συνέχεια, για καθεμιά από τις ορθόλογες πρωτεΐνες πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Blast (Altschul, et al., 1990). Η ομολογία των πρωτεϊνών στα διάφορα είδη με την αντίστοιχη πρωτεΐνη του ανθρώπου κυμαίνεται από 99.68% στα είδη *Pan paniscus* και *Pongo abelii* έως 35.74%

στο *Caenorhabditis elegans*. Η αναζήτηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στους οργανισμούς αυτούς πραγματοποιήθηκε στις βάσεις δεδομένων BioGRID και Intact. Η βάση δεδομένων BioGRID δίνει πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις για τα είδη *Drosophila melanogaster* (Εικόνα 47 Α) και *Mus musculus* (Εικόνα 47 Β). Επιπλέον, στη βάση δεδομένων IntAct εντοπίστηκε πρωτεϊνική αλληλεπίδραση ανάμεσα στη FRA10AC1 του ανθρώπου με την Xpo1 του *Mus musculus* (Εικόνα 47 Γ).



Εικόνα 47: Α. Το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της ορθόλογης πρωτεΐνης FRA10AC1 στο είδος *Drosophila melanogaster*. Β. Το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της ορθόλογης πρωτεΐνης FRA10AC1 στο είδος *Mus musculus*. Γ. Η αλληλεπίδραση της FRA10AC1 του ανθρώπου με την Xpo1 του είδους *Mus musculus*.

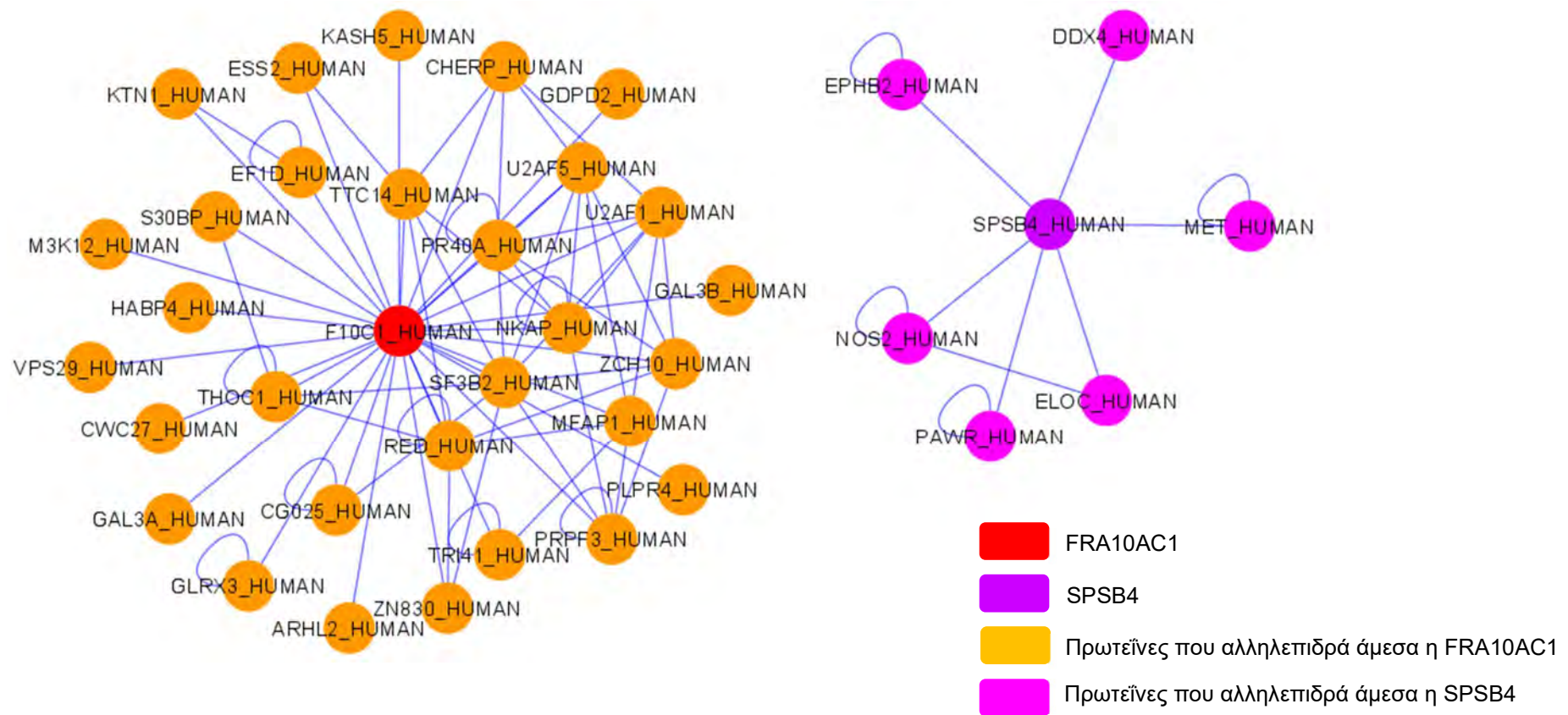
Χρησιμοποιώντας το εργαλείο του NCBI HomoloGene και τη βάση δεδομένων FlyBase έγινε αντιστοίχιση των πρωτεϊνών με τις ορθόλογές τους στον άνθρωπο (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Αντιστοίχιση των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά άμεσα η ορθόλογη της FRA10AC1 σε άλλους οργανισμούς με τις ορθόλογες στον άνθρωπο.

Πρωτεΐνη	Ορθόλογη στον άνθρωπο
ES2 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	ESS2
GUS (<i>Drosophila melanogaster</i>)	SPSB4
RPL30 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	RPL30
RPS14A (<i>Drosophila melanogaster</i>)	RPS14
RPS14B (<i>Drosophila melanogaster</i>)	RPS14
PRPF3 (<i>Mus musculus</i>)	PRPF3
THOC1 (<i>Mus musculus</i>)	THOC1
Xpo1 (<i>Mus musculus</i>)	XPO1

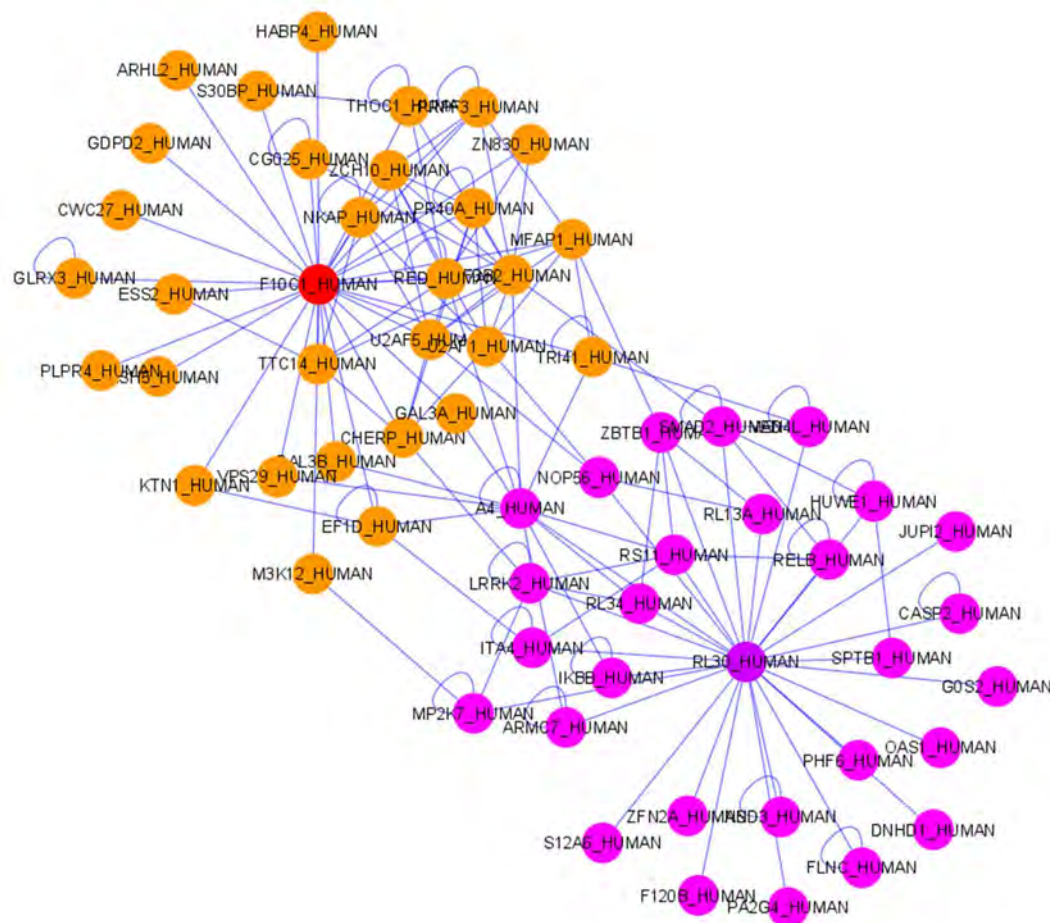
Στο είδος *Drosophila melanogaster* η πρωτεΐνη CG16890 που είναι ορθόλογη της FRA10AC1 του ανθρώπου αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες GUS, RPL30, RPS14B, RPS14A και ES2.

Η πρωτεΐνη GUS είναι ορθόλογη της πρωτεΐνης SPSB4 του ανθρώπου. Η πρωτεΐνη SPSB4 αποτελεί μόριο αναγνώρισης του συμπλέγματος E3 λιγάση ουμπικιτίνης-πρωτεΐνης που μεσολαβεί στην ουβικιτινοποίηση και την επακόλουθη πρωτεασωματική αποδόμηση πρωτεϊνών στόχων (Nishiya, et al., 2011; Kamura, et al., 2004). Επιπλέον, ρυθμίζει αρνητικά την παραγωγή νιτρικού οξειδίου (NO) και περιορίζει την κυτταρική τοξικότητα σε ενεργοποιημένα μακροφάγα μέσω της διαμεσολάβησης και της πρωτεασωματικής αποδόμησης του NOS2 (Nishiya, et al., 2011). Η SPSB4 δεν αλληλεπιδρά με τη FRA10AC1 στον άνθρωπο, ενώ αναζητώντας ακόμη και τους πρώτους γείτονες των δύο πρωτεϊνών δεν εντοπίζεται αλληλεπίδραση μεταξύ τους (Εικόνα 48).



Εικόνα 48: Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 και της SPSB4 στον άνθρωπο. Με κόκκινο κόμβο παρουσιάζεται η FRA10AC1 και με πορτοκαλί οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά. Με μωβ κόμβο παρουσιάζεται η SPSB4 και με φούξια οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά.

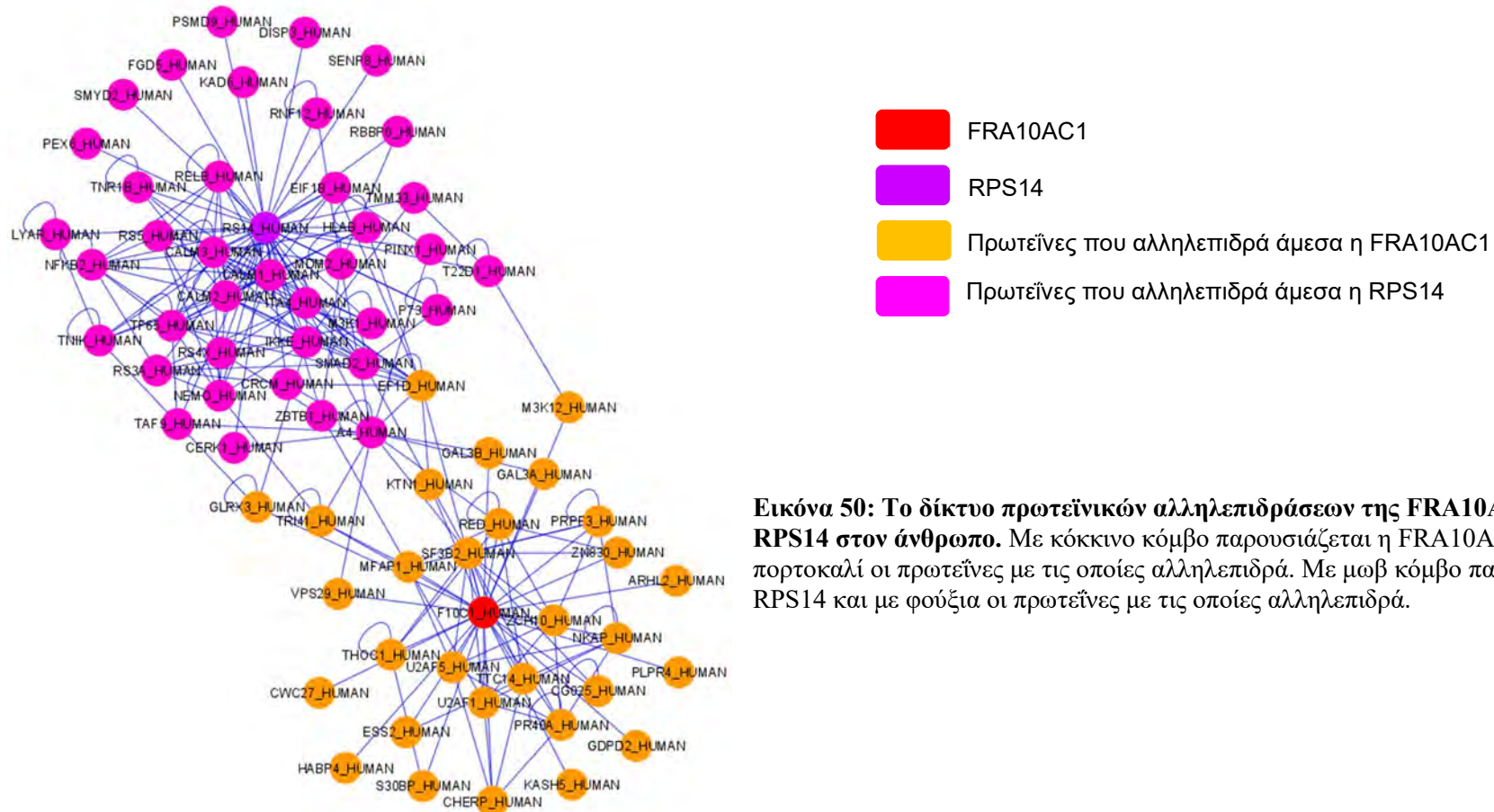
Η πρωτεΐνη RPL30 είναι ορθόλογη της RPL30 πρωτεΐνης που συμμετέχει στη μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος του ανθρώπου. Η FRA10AC1 του ανθρώπου αλληλεπιδρά με τη RPL30 με τουλάχιστον δύο ενδιάμεσους κόμβους (Εικόνα 49).



- FRA10AC1
- RPL30
- Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά άμεσα η FRA10AC1
- Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά άμεσα η RPL30

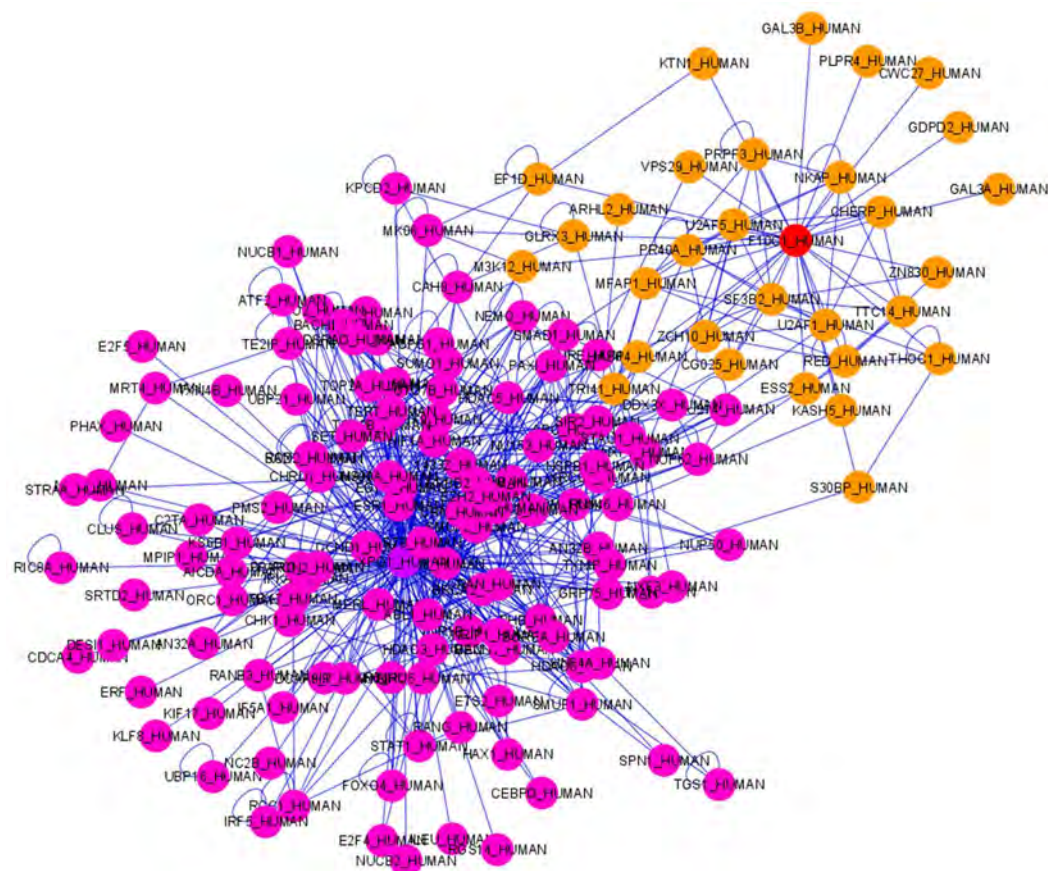
Εικόνα 49: Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 και της RPL30 στον άνθρωπο. Με κόκκινο κόμβο παρουσιάζεται η FRA10AC1 και με πορτοκαλί οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά. Με μωβ κόμβο παρουσιάζεται η RPL30 και με φούξια οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά.

Οι πρωτεΐνες RPS14A και RPS14B της *Drosophila melanogaster* είναι ορθόλογες της RPS14 του ανθρώπου που συμμετέχει στο σχηματισμό της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος. Η FRA10AC1 του ανθρώπου αλληλεπιδρά με τη RPS14 με τουλάχιστον δύο ενδιάμεσους κόμβους (Εικόνα 50).



Εικόνα 50: Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 και της RPS14 στον άνθρωπο. Με κόκκινο κόμβο παρουσιάζεται η FRA10AC1 και με πορτοκαλί οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά. Με μωβ κόμβο παρουσιάζεται η RPS14 και με φούξια οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά.

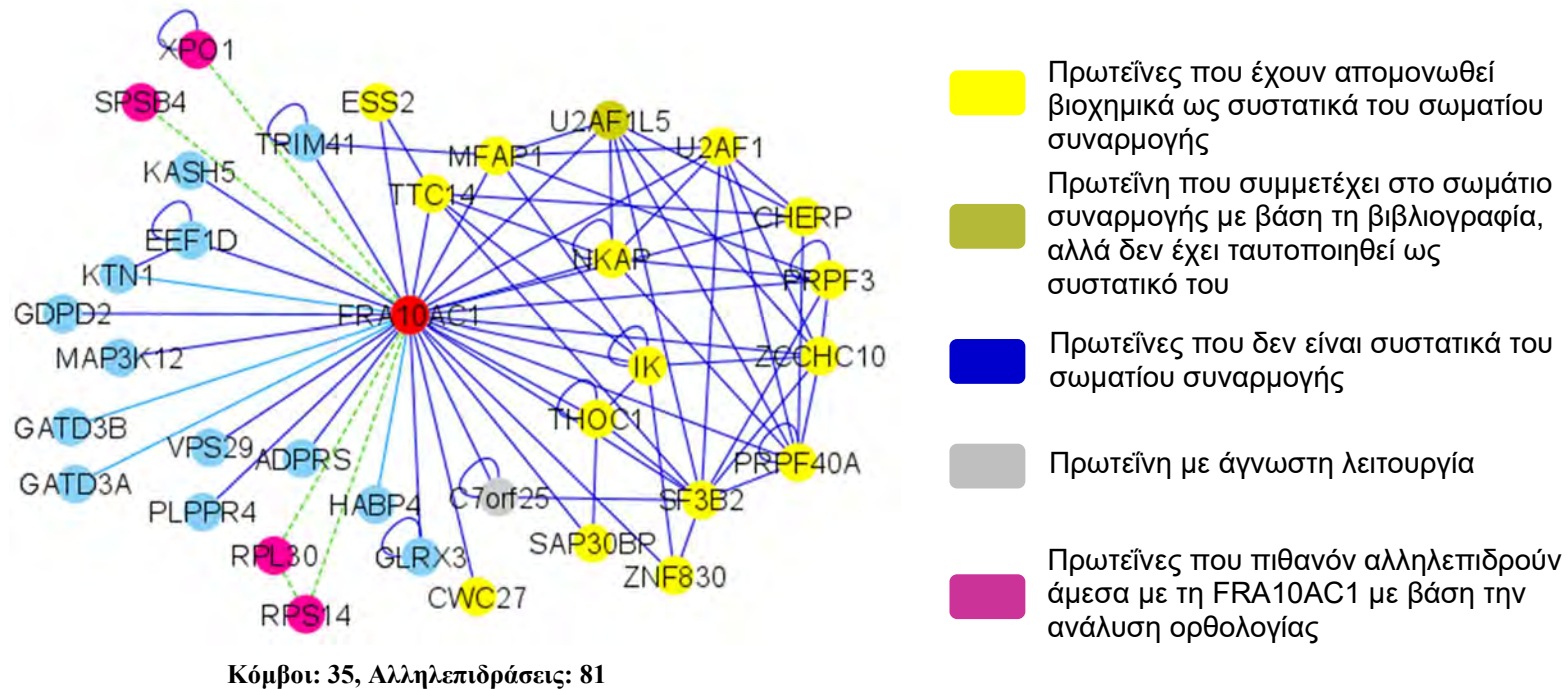
Η Xpo1 του ποντικού είναι ορθόλογη της XPO1 του ανθρώπου, που συμμετέχει στην πυρηνική εξαγωγή των RNAs (Boulton, et al., 2004), όπως και η THOC1 που αλληλεπιδρά άμεσα με τη FRA10AC1, και πρωτεϊνών που φέρουν πυρηνικό σήμα εξαγωγής πλούσιο σε λευκίνη (Fornerod, et al., 1997; Ossareh-Nazari, et al., 1997). Κάνοντας αναζήτηση των πρώτων γειτόνων των πρωτεϊνών FRA10AC1 και XPO1 βρέθηκε ότι οι δύο πρωτεΐνες στον άνθρωπο αλληλεπιδρούν με τουλάχιστον δύο ενδιαμέσους κόμβους (Εικόνα 51).



- FRA10AC1
- XPO1
- Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά άμεσα η FRA10AC1
- Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά άμεσα η XPO1

Εικόνα 51: Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 και της XPO1 στον άνθρωπο. Με κόκκινο κόμβο παρουσιάζεται η FRA10AC1 και με πορτοκαλί οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά. Με μωβ κόμβο παρουσιάζεται η XPO1 και με φούξια οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά.

Θεωρώντας ότι αν δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν σε έναν οργανισμό, τότε θα αλληλεπιδρούν και οι ορθόλογες αυτών, δημιουργήθηκε ένα δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1, που περιλαμβάνει και αλληλεπιδράσεις πρόβλεψης βάσει των αλληλεπιδράσεων των ορθόλογων πρωτεϊνών (Εικόνα 52).



Εικόνα 52: Το διευρυμένο δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με δεδομένα από ορθόλογες πρωτεΐνες. Το δίκτυο αποτελείται από 35 κόμβους και 81 αλληλεπιδράσεις. Η FRA10AC1 παρουσιάζεται με κόκκινο κόμβο. Οι κόμβοι με κίτρινο χρώμα αναπαριστούν πρωτεΐνες που έχουν απομονωθεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής. Με λαδί κόμβο παρουσιάζεται η U2AF1L5, η οποία σύμφωνα με τη UniProt συμμετέχει στο σωματίο συναρμογής, αλλά δεν έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό του (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Με κόμβο μπλε χρώματος παρουσιάζονται πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε λειτουργίες εκτός του σωματίου συναρμογής. Με κόμβο γκρι χρώματος παρουσιάζεται η C7orf25 που έχει άγνωστη λειτουργία. Με μωβ κόμβο παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά η FRA10AC1 σε άλλους οργανισμούς. Με πράσινη διακεκομμένη γραμμή σημαίνονται οι αλληλεπιδράσεις που βασίζονται σε δεδομένα αλληλεπιδράσεων των ορθόλογων πρωτεϊνών.

Ανάλυση της έκφρασης των γειτόνων της FRA10AC1

Τα δεδομένα έκφρασης σε ιστούς που εξορύχθηκαν από τη βάση δεδομένων GTEx αναλύθηκαν προκειμένου να προσδιοριστεί για κάθε γονίδιο ο ιστός στον οποίο παρουσιάζει μέγιστη και ελάχιστη έκφραση, ο μέσος όρος και η διάμεσος της έκφρασής του (Πίνακας 14). Για να υπάρχει αντιστοίχιση με τα αποτελέσματα και τις εικόνες από προηγούμενες αναλύσεις, χρησιμοποιήθηκαν οι κωδικοί ταυτοποίησης Gene name (primary) που χρησιμοποιήθηκαν και στην αναπαράσταση των δικτύων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Επιπλέον, υπολογίστηκε για κάθε ιστό το γονίδιο που έχει τη μεγαλύτερη και μικρότερη έκφραση (Παράρτημα 3).

Παρατηρήθηκε ότι τα περισσότερα γονίδια παρουσιάζουν μέγιστη τιμή έκφρασης στον ιστό των όρχεων (Testis) (*PLPPR4*, *ZCCHC10*, *TRIM41*, *EEF1D*, *GLRX3*, *SF3B2*, *MFAP1*, *THOC1*, *KASH5*, *ESS2*) και στις ωοθήκες (Ovary) (*ADPRS*, *PRPF40A*, *CWC27*, *HABP4*, *CHERP*, *NKAP*). Τα περισσότερα γονίδια παρουσιάζουν τη χαμηλότερη τιμή έκφρασης στο συκώτι (Liver) (*CWC27*, *FRA10AC1*, *MAP3K12*, *VPS29*, *KTN1*, *MFAP1*, *ESS2*, *GDPD2*) (Πίνακας 14). Τα γονίδια με την υψηλότερη τιμή έκφρασης στους ιστούς είναι τα *SF3B2* και *IK* (Εικόνα 53).

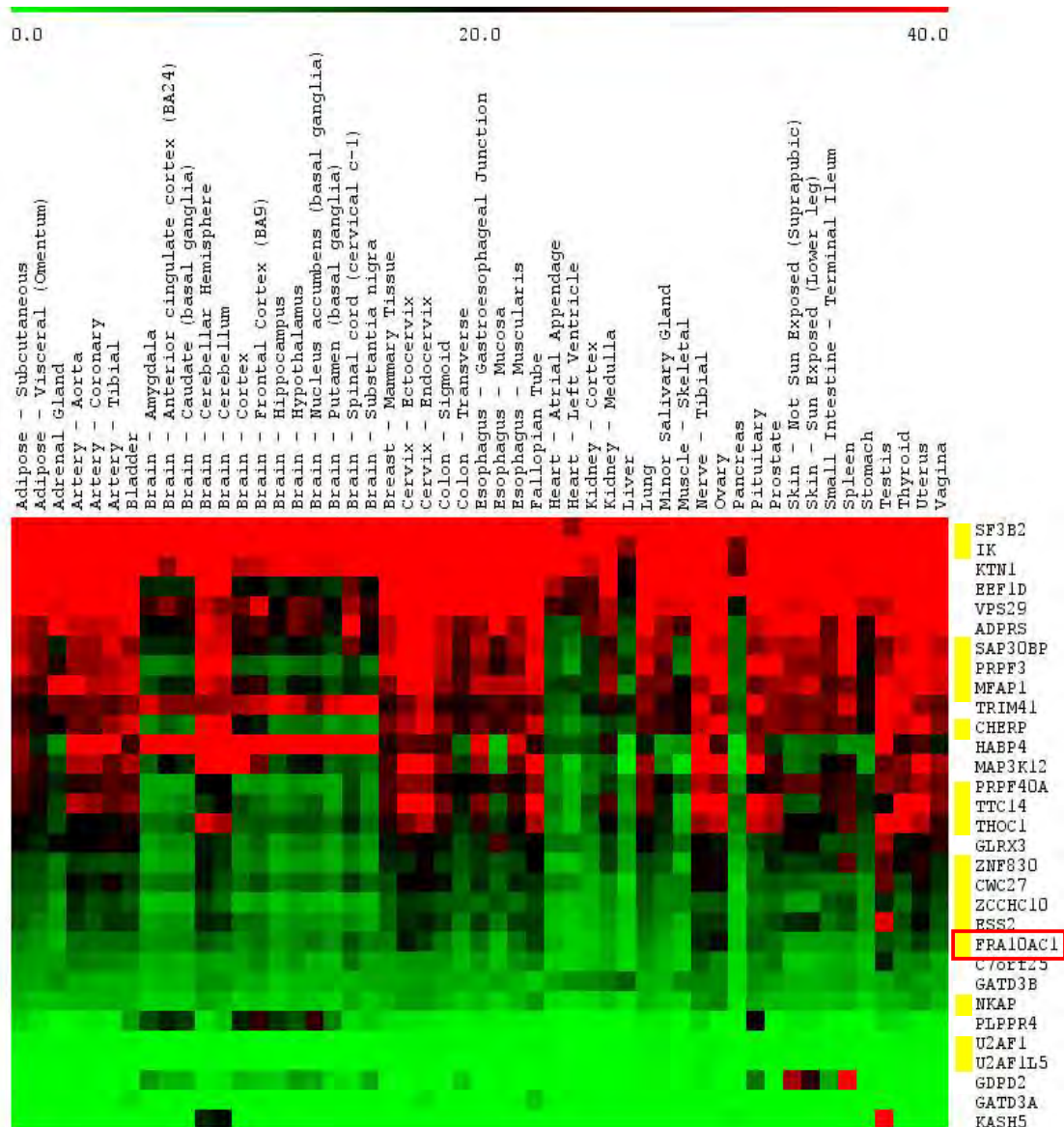
Βάσει της διαμέσου της έκφρασης παρατηρούνται 4 διακριτές ομάδες. Στην πρώτη ομάδα περιλαμβάνονται γονίδια με σημαντικά υψηλή έκφραση στους περισσότερους ιστούς (Median > 50), όπου συμπεριλαμβάνονται τα *SF3B2*, *IK*, *KTN1* και *EEF1D*. Στη δεύτερη ομάδα περιλαμβάνονται γονίδια με σχετικά υψηλή έκφραση στους περισσότερους ιστούς (10 < Median < 50) και αποτελείται από τα γονίδια *VPS29*, *ADPRS*, *SAP30BP*, *PRPF3*, *MFAP1*, *TRIM41*, *CHERP*, *HABP4*, *MAP3K12*, *PRPF40A*, *TTC14*, *THOC1*, *GLRX3*, *ZNF830*, *CWC27*, *ZCCHC10* και *ESS2*. Τα γονίδια *FRA10AC1*, *C7orf25*, *GATD3B*, *NKAP* και *PLPPR4* παρουσιάζουν σχετικά χαμηλή έκφραση σε όλους τους ιστούς (1 < Median < 10), ενώ τα γονίδια *U2AF1*, *U2AFIL5*, *GDPD2*, *GATD3A* και *KASH5* παρουσιάζουν σχεδόν μηδενική έκφραση στους περισσότερους ιστούς (Median < 1). Το *FRA10AC1* έχει μία μέση τιμή έκφρασης περίπου 10 και βρίσκεται στη μέση της κλίμακας μέσης έκφρασης των 31 γονιδίων. Σημειώνεται, επίσης, ότι η μέση τιμή γονιδιακής έκφρασης των συστατικών του σωματίου συναρμογής κυμαίνεται σε όλες τις τάξεις μεγέθους γονιδιακής έκφρασης (Πίνακας 14, Παράρτημα 3, Εικόνα 53).

Πίνακας 14: Ανάλυση των δεδομένων έκφρασης των γονιδίων ως προς τη μέγιστη και ελάχιστη τιμή, το μέσο όρο, τη διάμεσο και το συντελεστή διακύμανσης. Τα γονίδια ταξινομούνται κατά φθίνουσα σειρά με βάση τη διάμεση τιμή έκφρασης στους ιστούς.

Γονίδιο	Ιστός στον οποίο παρουσιάζει τη μέγιστη έκφραση	Μέγιστη τιμή έκφρασης	Ιστός στον οποίο παρουσιάζει την ελάχιστη έκφραση	Ελάχιστη τιμή έκφρασης	Μέση τιμή	Διάμεσος	Συντελεστής διακύμανσης	Μέση τιμή / Διάμεσος
<i>SF3B2</i>	Testis	196.48	Heart - Left Ventricle	31.96	107.37	109.40	42%	1.02
<i>IK</i>	Uterus	218.23	Pancreas	28.34	94.86	96.94	41%	1.02
<i>KTN1</i>	Muscle - Skeletal	129.38	Liver	22.59	65.95	66.47	39%	1.01
<i>EEF1D</i>	Testis	131.18	Brain - Putamen (basal ganglia)	15.38	50.17	52.46	49%	1.05
<i>VPS29</i>	Artery - Tibial	82.93	Liver	17.93	42.56	38.90	37%	0.91
<i>ADPRS</i>	Ovary	69.31	Pancreas	11.53	33.99	34.65	36%	1.02
<i>SAP30BP</i>	Nerve - Tibial	61.97	Heart - Left Ventricle	10.55	28.51	30.02	37%	1.05
<i>PRPF3</i>	Brain - Nucleus accumbens (basal ganglia)	61.92	Heart - Left Ventricle	7.89	29.09	29.76	52%	1.02
<i>MFAP1</i>	Testis	45.55	Liver	9.23	28.24	29.27	35%	1.04
<i>TRIM41</i>	Testis	102.72	Fallopian Tube	11.33	31.62	28.51	49%	0.90
<i>CHERP</i>	Ovary	44.47	Brain - Substantia nigra	8.17	24.45	26.50	44%	1.08
<i>HABP4</i>	Ovary	101.14	Brain - Putamen (basal ganglia)	3.35	35.19	25.59	75%	0.73
<i>MAP3K12</i>	Brain - Cerebellum	170.70	Liver	1.82	30.21	23.32	103%	0.77
<i>PRPF40A</i>	Ovary	34.34	Heart - Left Ventricle	5.99	19.28	19.83	45%	1.03
<i>TTC14</i>	Nerve - Tibial	60.75	Heart - Left Ventricle	4.83	23.32	19.69	63%	0.84
<i>THOC1</i>	Testis	44.06	Heart - Left Ventricle	5.37	20.69	19.50	46%	0.94
<i>GLRX3</i>	Testis	33.57	Brain – Amygdala	7.16	15.84	16.93	36%	1.07
<i>ZNF830</i>	Spleen	26.99	Heart - Left Ventricle	4.58	13.53	14.49	41%	1.07

<i>CWC27</i>	Ovary	27.61	Liver	3.30	13.69	12.74	35%	0.93
<i>ZCCHC10</i>	Testis	17.34	Pancreas	4.07	10.36	11.49	38%	1.11
<i>ESS2</i>	Testis	37.91	Liver	3.87	11.91	11.45	47%	0.96
<i>FRA10AC1</i>	Brain - Frontal Cortex (BA9)	18.89	Liver	3.60	9.78	9.82	36%	1.00
<i>C7orf25</i>	Brain - Spinal cord (cervical c-1)	17.06	Heart - Left Ventricle	2.95	7.32	7.33	35%	1.00
<i>GATD3B</i>	Liver	12.20	Pancreas	2.76	6.86	6.60	25%	0.96
<i>NKAP</i>	Ovary	9.26	Pancreas	1.76	4.93	4.88	34%	0.99
<i>PLPPR4</i>	Testis	23.80	Fallopian Tube	0.02	4.51	1.59	147%	0.35
<i>U2AF1</i>	Lung	1.10	Brain – Amygdala	0.10	0.53	0.55	57%	1.04
<i>U2AF1L5</i>	Lung	0.74	Brain - Anterior cingulate cortex (BA24)	0.07	0.34	0.37	56%	1.10
<i>GDPD2</i>	Spleen	128.28	Liver	0.02	5.32	0.33	348%	0.06
<i>GATD3A</i>	Fallopian Tube	4.19	Pancreas	0.14	0.46	0.31	139%	0.66
<i>KASH5*</i>	Testis	114.00	Heart - Left Ventricle	0.01	2.99	0.03	543%	0.01

*Λόγω σημαντικής ιστοειδικότητας δε συμπεριλαμβάνεται στις αναλύσεις συσταδοποίησης.



Εικόνα 53: Γραφική αναπαράσταση των διάμεσων τιμών έκφρασης στους ιστούς των μελών του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1.

Σύμφωνα με το συντελεστή διακύμανσης όλα τα γονίδια παρουσιάζουν διακύμανση της έκφρασής τους στους διάφορους ιστούς. Τη χαμηλότερη διακύμανση παρουσιάζει το γονίδιο *GATD3B* (CoV = 25%) και τη μεγαλύτερη το *KASH5* (CoV = 543%), υποδεικνύοντας σημαντική ιστοειδικότητα. Πράγματι, το *KASH5* εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στους όρχεις (Testis-TPM = 114), σε μικρότερο βαθμό στην παρεγκεφαλίδα (Cerebellar Hemisphere-TPM = 17.09, Cerebellum-TPM = 18.9), σε ακόμη μικρότερο βαθμό στο πάγκρεας (Pancreas-TPM = 1.04) και στους υπόλοιπους ιστούς παρουσιάζει μηδενική έκφραση (TPM < 0.1). Θεωρώντας ότι οι τιμές TPM < 0.1 υποδεικνύουν μηδενική έκφραση, το *KASH5* δεν εκφράζεται στους 47 από τους 51

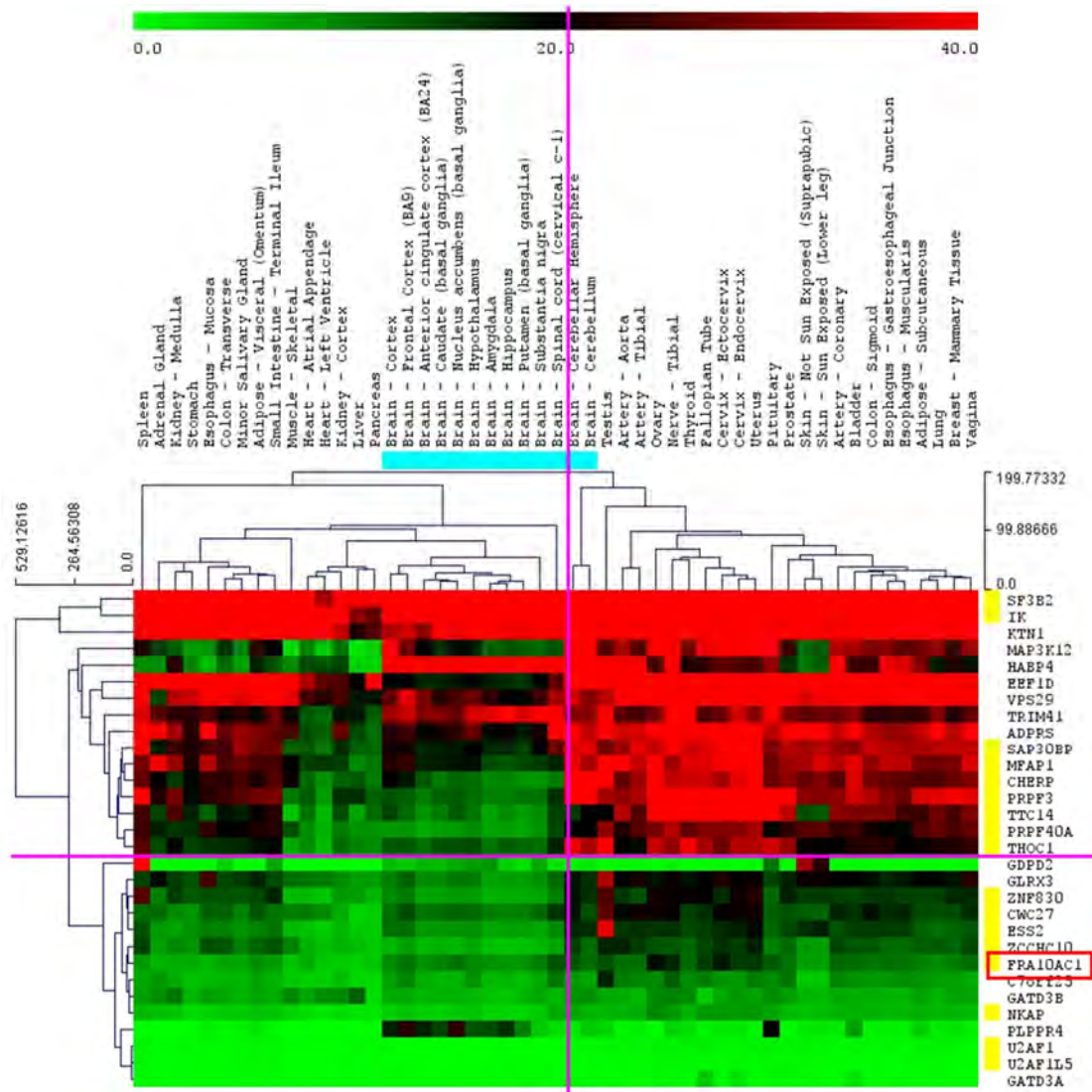
ιστούς και έτσι αποκλείστηκε από τις περαιτέρω αναλύσεις (Πίνακας 14, Παράρτημα 3, Εικόνα 53).

Σημαντική διακύμανση παρουσιάζει και το *GDPD2* (CoV = 348%), το οποίο εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο σπλήνα (Spleen-TPM = 128.28), στο δέρμα (Sun Exposed Skin-TPM = 23.09, Not Sun Exposed Skin-TPM = 32.75), στους βλεννογόνους (Pituitary-TPM = 10.48), στο έντερο (Small Intestine-TPM = 6.79, Colon-TPM = 3.58) και στον εγκέφαλο (min TPM = 1.04 (Cerebellar Hemisphere), max TPM = 8.09 (Amygdala)), ενώ στους υπόλοιπους ιστούς παρουσιάζει σχεδόν μηδενική τιμή έκφρασης (TPM < 1). Άλλα γονίδια που παρουσιάζουν ιστοειδικότητα είναι το *PLPPR4* που εκφράζεται κυρίως στους βλεννογόνους (Pituitary-TPM = 20.69), την ουρήθρα (Bladder-TPM = 7.3) και τον εγκέφαλο (min TPM = 1.87 (Cerebellar Hemisphere), max TPM = 23.8 (Nucleus accumbens)) και το *GATD3A* που εκφράζεται κυρίως στις σάλπιγγες (Fallopian tube-TPM = 4.18). Επιπλέον, παρατηρείται ότι πολύ μικρή διάμεσο (Median < 0.1) παρουσιάζουν και τα γονίδια *U2AF1* και *U2AFIL5*, τα οποία, όμως, έχουν συστηματικά χαμηλή έκφραση σε όλους τους ιστούς (Πίνακας 14, Παράρτημα 3, Εικόνα 53).

Στην Εικόνα 54 ομαδοποιούνται τα γονίδια ως προς την έκφρασή τους στους διάφορους ιστούς. Στην Ευκλείδεια απόσταση, αυτή η ομαδοποίηση συμβαδίζει σε μεγάλο βαθμό με την τάξη μεγέθους της διάμεσης έκφρασης των γονιδίων στους διάφορους ιστούς, με τα γονίδια που έχουν σε πολλούς ιστούς υψηλή τιμή έκφρασης να εμφανίζονται στις επάνω ομάδες του ιεραρχικού δέντρου και αυτά με χαμηλή τιμή έκφρασης στην κάτω ομάδα (Εικόνα 54). Βάσει της ιεραρχικής ομαδοποίησης βάσει Ευκλείδειας απόστασης το *FRA10AC1* ομαδοποιείται με τα γονίδια *ZCCHC10*, *C7orf25*, *GATD3B* και *NKAP* (Εικόνα 54).

Εφαρμόζοντας ιεραρχική ομαδοποίηση βάσει Ευκλείδειας απόστασης παρατηρείται ότι ο σπλήνας δεν ομαδοποιείται με τους άλλους ιστούς, λόγω της σημαντικά διαφοροποιημένης έκφρασης του γονιδίου *GDPD2* στον ιστό αυτό. Παρατηρείται στην ιεραρχική ομαδοποίηση ότι δημιουργούνται δύο κύριες ομάδες ιστών, όπου στη μία όλα τα μέλη του δικτύου έχουν αυξημένες τιμές έκφρασης και στην άλλη έχουν μειωμένες τιμές έκφρασης (Εικόνα 54). Χαρακτηριστικά, στη μία ομάδα ταξινομούνται οι εγκεφαλικοί ιστοί εκτός της παρεγκεφαλίδας, ο μυς, η καρδιά και οι ιστοί του γαστρεντερικού συστήματος, ενώ στην άλλη ομάδα η παρεγκεφαλίδα, οι όρχεις, οι ωοθήκες και οι αρτηρίες. Η παρεγκεφαλίδα παρουσιάζει σημαντική

διαφοροποίηση ως προς την έκφραση των γονιδίων από τους υπόλοιπους ιστούς του εγκεφάλου, αφού διαχωρίζεται εξαρχής σε διαφορετικές ομάδες. Επιπλέον, το πρότυπο έκφρασης των νευρικών κυττάρων προσομοιάζει περισσότερο αυτό της παρεγκεφαλίδας.



Εικόνα 54: Ανάλυση της έκφρασης των γειτόνων της FRA10AC1 με ιεραρχική ομαδοποίηση βάσει Ευκλείδειας απόστασης. Με κίτρινο σημαίνουν τα μέλη του δικτύου που αποτελούν συστατικά του σωματείου συναρμογής και με γαλάζιο οι ιστοί του εγκεφάλου.

Οι ιστοί των αρτηριών και των φλεβών ομαδοποιούνται στην ίδια ομάδα, αλλά ξεχωρίζουν από τον ιστό της καρδιάς, που ομαδοποιείται με το μυϊκό ιστό. Επιπλέον, παρατηρείται διαχωρισμός των διαφορετικών τμημάτων του οισοφάγου (βλεννογόνο-μυϊκό τοίχωμα) και του εντέρου (σιγμοειδές-εγκάρσιο τμήμα), υποδεικνύοντας τη σημαντική διαφοροποίηση που υπάρχει λόγω της εξειδικευμένης λειτουργίας που

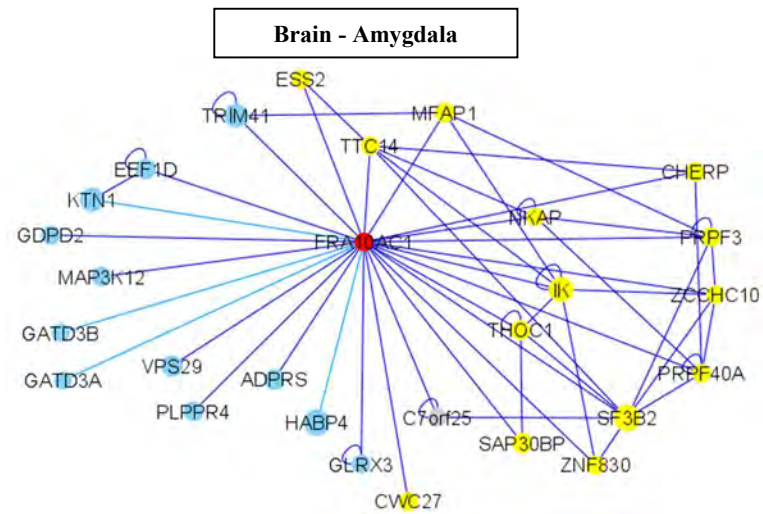
επιτελούν τα ξεχωριστά τμήματα. Αυτό είναι σημαντική παρατήρηση, καθώς παρατηρείται ιστοειδικότητα στο δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 ως προς το πρότυπο έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων.

Σύμφωνα με το συντελεστή διακύμανσης (Πίνακας 14) τα γονίδια παρουσιάζουν σημαντική ιστοειδικότητα όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασής τους. Προκειμένου να οπτικοποιηθεί η ιστοειδικότητα αυτή στο δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 ανακατασκευάστηκαν δίκτυα όπου το μέγεθος των κόμβων είναι ανάλογο της έκφρασης κάθε γονιδίου (Παράρτημα 4). Χαρακτηριστικά παρουσιάζονται τα δίκτυα άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 στην αμυγδαλή και την παρεγκεφαλίδα του εγκεφάλου, την ωοθήκη και τους όρχεις (Εικόνα 55).

Πράγματι η ανακατασκευή των δικτύων ορίζοντας το μέγεθος των κόμβων ανάλογο της έκφρασης κάθε γονιδίου στον ιστό δείχνει τη σημαντική διαφοροποίηση που παρατηρείται και στις αριθμητικές τιμές. Ανάμεσα στην παρεγκεφαλίδα και τους άλλους ιστούς του εγκεφάλου παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση και ως προς τη σύσταση των μελών του δικτύου, αλλά και ως προς την έκφραση των πρωτεϊνών. Στην παρεγκεφαλίδα εκφράζονται τα γονίδια *KASH5*, *U2AF1* και *U2AF1L5* που δεν εκφράζονται στην αμυγδαλή, ενώ υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση και στα επίπεδα έκφρασης των *SF3B2*, *IK* και *MAP3K12*, που εκφράζονται με μεγαλύτερη ένταση στην παρεγκεφαλίδα (Εικόνα 55 Α και Β).

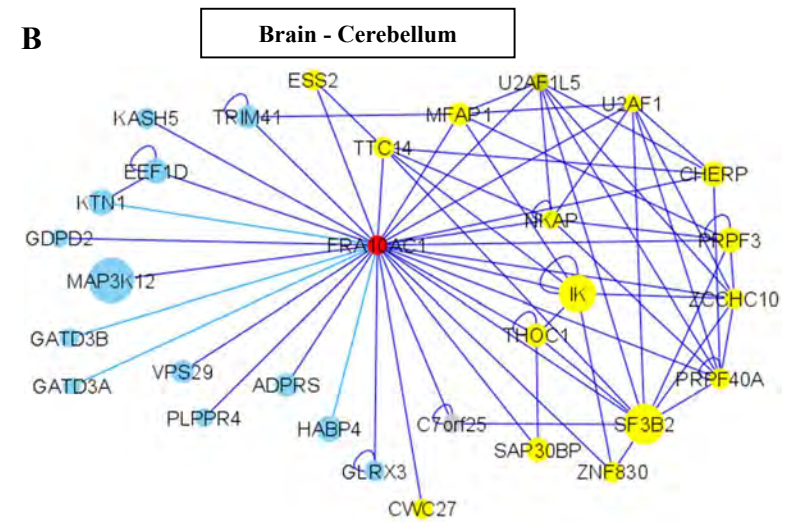
Σημαντική διαφοροποίηση παρατηρείται και ανάμεσα στις γονάδες των δύο φύλων (όρχεις και ωοθήκες). Στους ιστούς αυτούς τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του σωματίου συναρμογής εκφράζονται έντονα, υποδεικνύοντας αύξηση της ενεργότητας της συναρμογής. Στις γονάδες έχουν εντοπιστεί πολυάριθμα εναλλακτικά μετάγραφα, τα οποία είναι πιθανόν απαραίτητα για να μπορέσει να επιτευχθεί η λεπτή ρύθμιση που γίνεται στα γονίδια κατά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των γαμετικών κυττάρων (Xu, et al., 2002). Επιπλέον, στον ιστό των όρχεων παρατηρείται σημαντική έκφραση των γονιδίων *KASH5* και *PLPPR4* που δεν εκφράζονται στις ωοθήκες, ενώ δεν εκφράζεται το *GDPD2*, γονίδιο που είναι μεταγραφικά ενεργό στην ωοθήκη. Τα *KASH5* και *GDPD2* παίζουν ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και του κυτταροσκελετού και παρουσιάζουν αυξημένη ιστοειδικότητα (Εικόνα 55 Γ και Δ).

A



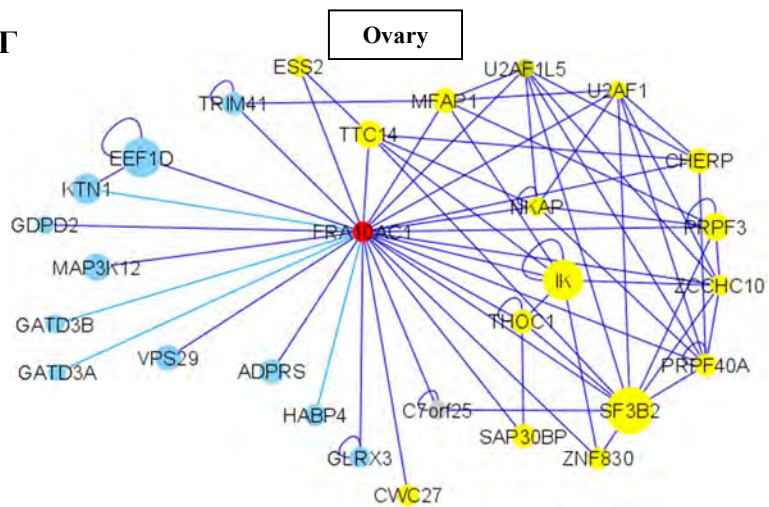
Κόμβοι: 28, Αλληλεπιδράσεις: 60

B



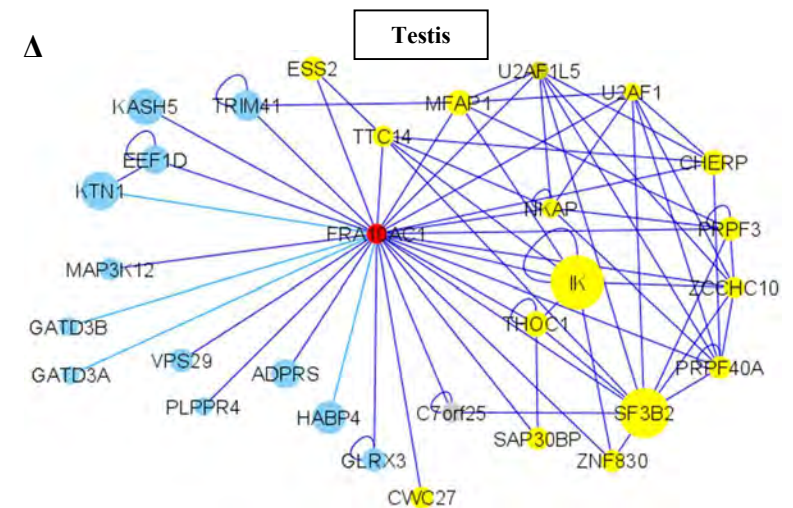
Κόμβοι: 31, Αλληλεπιδράσεις: 75

Γ



Κόμβοι: 29, Αλληλεπιδράσεις: 73

Δ



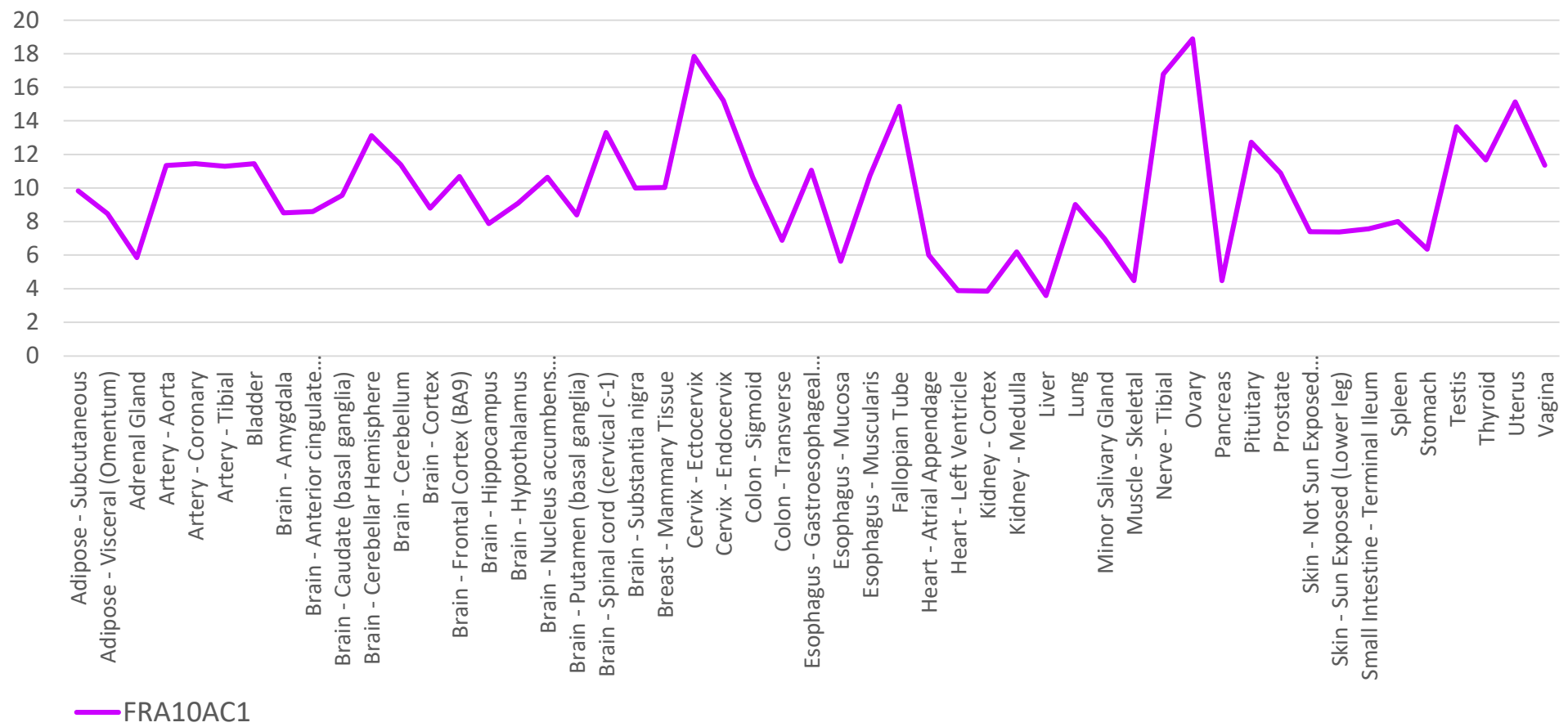
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74

Εικόνα 55: Ιστοειδικά δίκτυα άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1. Α: Αμυγδαλή. Β: Παρεγκεφαλίδα. Γ. Ωοθήκες. Δ. Όρχεις. Το μέγεθος των κόμβων είναι ανάλογο της έκφρασης του γονιδίου της πρωτεΐνης σε κάθε ιστό. Τιμές διάμεσης έκφρασης μικρότερες του 0.1 (TPM < 0.1) θεωρήθηκαν μηδενικές. Η FRA10AC1 παρουσιάζεται με κόμβο κόκκινου χρώματος. Οι κόμβοι με κίτρινο χρώμα αναπαριστούν πρωτεΐνες που έχουν απομονωθεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής. Με κόμβο λαδί χρώματος παρουσιάζεται η U2AF1L5 η οποία, σύμφωνα με τη UniProt, συμμετέχει στο σωματίο συναρμογής, αλλά δεν έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό του (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Με κόμβο μπλε χρώματος παρουσιάζονται πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε λειτουργίες εκτός του σωματίου συναρμογής. Με κόμβο γκρι χρώματος παρουσιάζεται η C7orf25 που έχει άγνωστη λειτουργία.

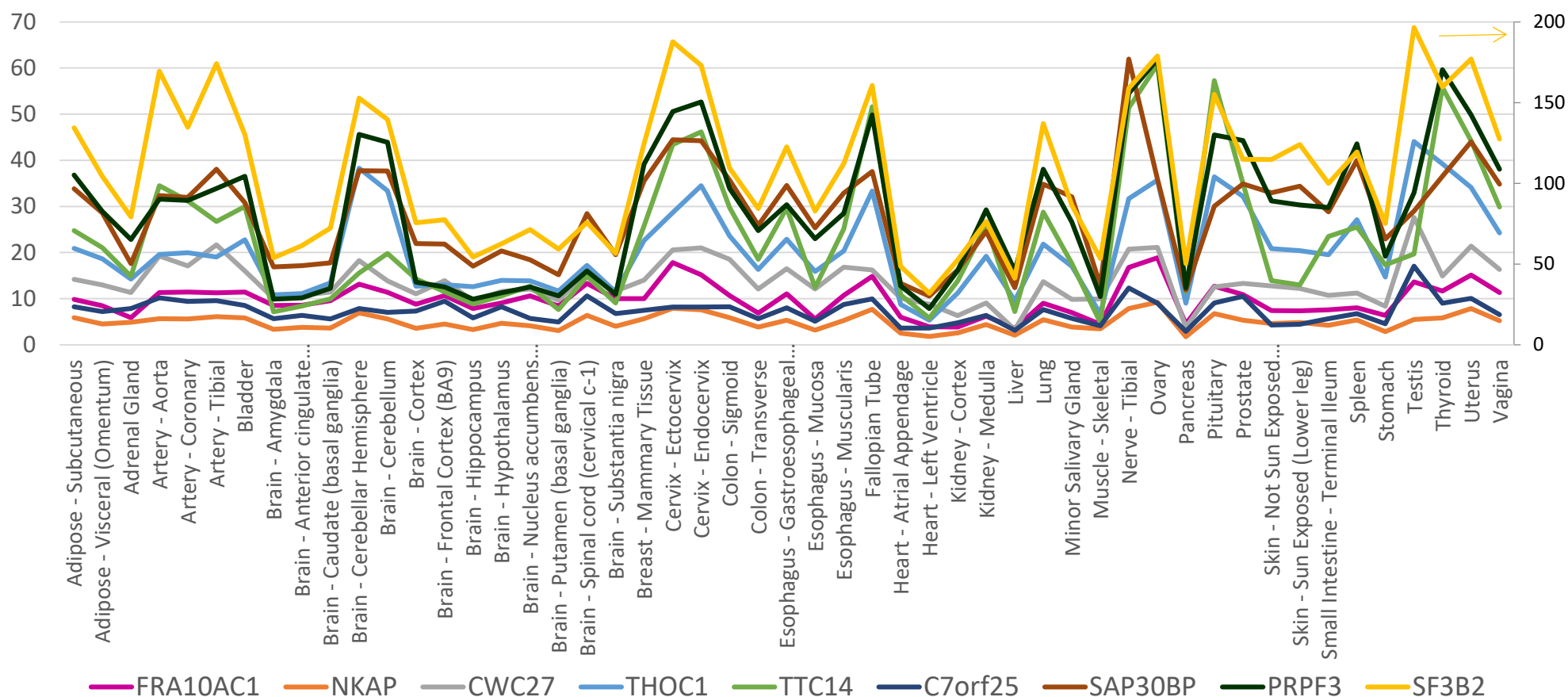
Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η μέθοδος αναγνώρισης μοτίβων Παυλίδη (ή διαφορετικά Pavlidis Template Matching). Με τη μέθοδο αυτή αναμένεται να προσδιοριστούν γονίδια με παρόμοιο μοτίβο έκφρασης με το *FRA10AC1*, που μπορεί να ανήκουν και σε διαφορετική τάξη μεγέθους με βάση τη διάμεση τιμή έκφρασής τους. Στην Εικόνα 56 παρουσιάζεται το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1* στους 51 ιστούς. Εφαρμόζοντας τη Μέθοδο Αναγνώρισης Προτύπων του Παυλίδη (Pavlidis Template Matching) εντοπίστηκαν οκτώ γονίδια με προφίλ έκφρασης στους διάφορους ιστούς με στατιστική ομοιότητα με αυτό του *FRA10AC1* (R) μεγαλύτερη από 70% (Πίνακας 15, Εικόνα 57). Το πιο κοντινό γονίδιο ως προς το μοτίβο έκφρασης στους διάφορους ιστούς είναι το *NKAP* με ομοιότητα R 91%, με αμέσως επόμενα το *CWC27* και το *SF3B2* με ομοιότητα R 84% και 80% αντίστοιχα. Όλα τα γονίδια με τα οποία ομαδοποιείται αποτελούν συστατικά του σωματίου συναρμογής, εκτός από το *C7orf25* που έχει άγνωστη λειτουργία. Το *FRA10AC1* παρουσιάζει παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με το *SF3B2* που αποτελεί το γονίδιο με την υψηλότερη έκφραση ανάμεσα στα μέλη του δικτύου. Επίσης, παρατηρείται ότι το *FRA10AC1* παρουσιάζει παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με το *SAP30BP* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του σωματίου συναρμογής SAP30BP, για την οποίαδείχθηκε πρωτύτερα ότι δεν εντοπίζεται σε κοινά σύμπλοκα του σωματίου συναρμογής με τη FRA10AC1 (Πίνακας 12, Εικόνα 46).

Πίνακας 15: Τα γονίδια με τα οποία ομαδοποιείται το *FRA10AC1* βάσει της Μεθόδου Ανάλυσης Προτύπων (Pavlidis Template Matching) με όριο ομοιότητας 0.7.

Γονίδιο	Τιμή ομοιότητας (R)
<i>NKAP</i>	0.91
<i>CWC27</i>	0.84
<i>SF3B2</i>	0.8
<i>THOC1</i>	0.76
<i>TTC14</i>	0.75
<i>C7orf25</i>	0.74
<i>SAP30BP</i>	0.74
<i>PRPF3</i>	0.71

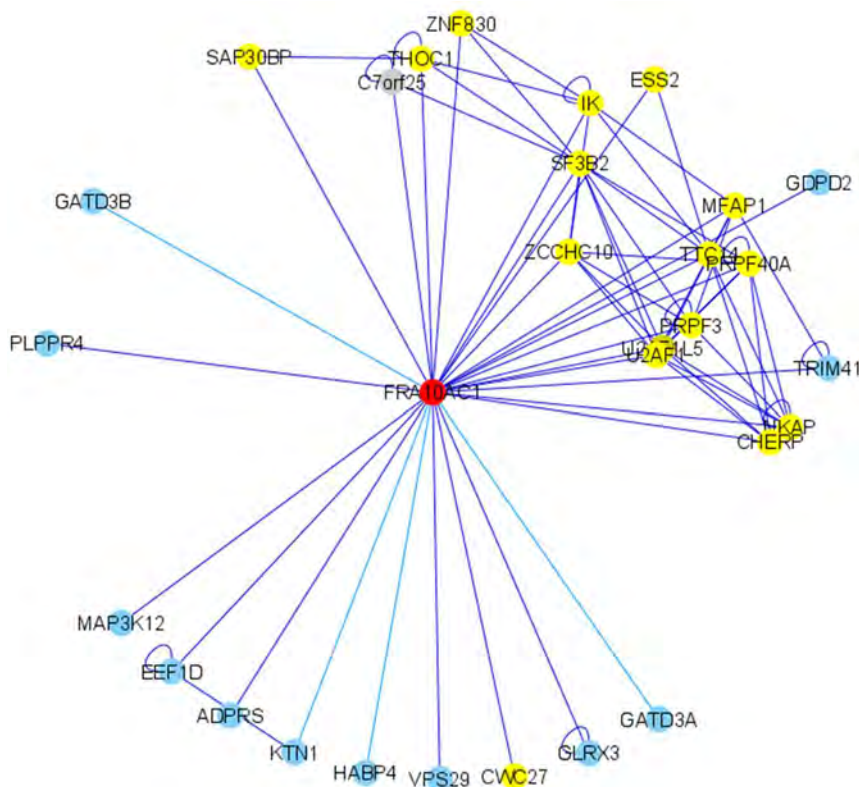


Εικόνα 56: Το πρότυπο έκφρασης του FRA10AC1 στους 51 ιστούς.



Εικόνα 57: Με τη Μέθοδο Αναγνώρισης Προτύπων του Παυλίδη εντοπίστηκαν 8 γονίδια με προφίλ έκφρασης στους διάφορους ιστούς με στατιστική ομοιότητα με αυτό του FRA10AC1 (R) μεγαλύτερη από 70%.

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 βάσει της στατιστικής ομοιότητας που παρουσιάζουν τα προφίλ έκφρασης των γονιδίων στους διάφορους ιστούς. Οι κόμβοι οι οποίοι αντιπροσωπεύουν γονίδια που παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα έκφρασης στους ιστούς βρίσκονται πιο κοντά μεταξύ τους στο δίκτυο, ενώ αυτοί που παρουσιάζουν μικρότερη ομοιότητα βρίσκονται πιο απομακρυσμένα (Εικόνα 58). Και με το δίκτυο αυτό επιβεβαιώνεται η στενή συσχέτιση των πρωτεϊνών του σωματίου συναρμογής, οι οποίες βρίσκονται πολύ κοντά στο δίκτυο, δείχνοντας ότι η έκφρασή τους ρυθμίζεται από έναν κοινό μηχανισμό, εκτός από τη CWC27. Επίσης, κοντά στο δίκτυο που σχηματίζεται από τις πρωτεΐνες του σωματίου συναρμογής βρίσκονται και οι TRIM41, GDPD2 και C7orf25, υποδεικνύοντας πιθανή συσχέτιση με το σωματίο συναρμογής.



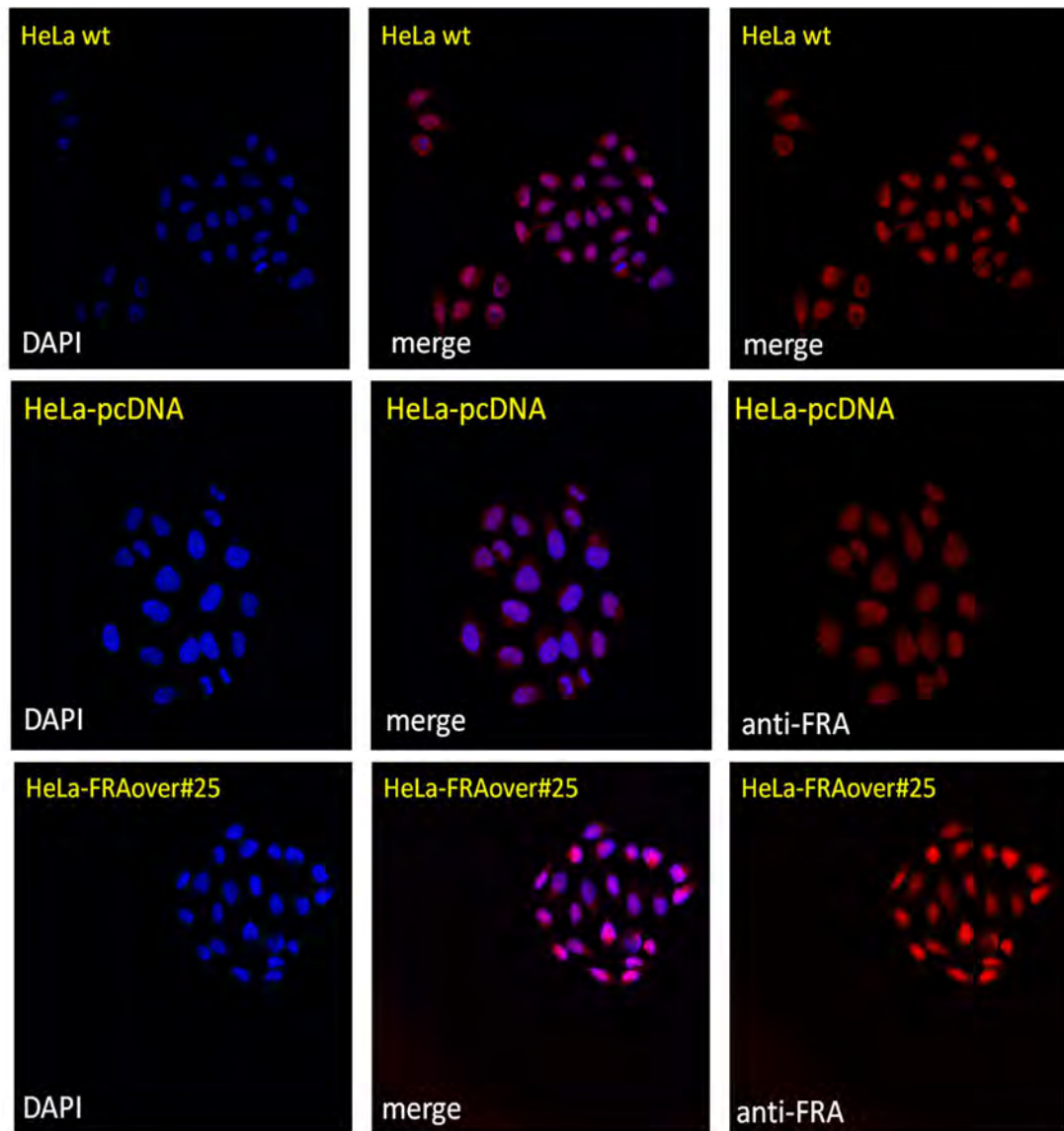
Εικόνα 58: Το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 βάσει της στατιστικής ομοιότητας που παρουσιάζουν τα προφίλ έκφρασης των γονιδίων στους διάφορους ιστούς. Οι κόμβοι οι οποίοι αντιπροσωπεύουν γονίδια που παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα έκφρασης στους ιστούς βρίσκονται πιο κοντά μεταξύ τους στο δίκτυο, ενώ αυτοί που παρουσιάζουν μικρότερη ομοιότητα βρίσκονται πιο απομακρυσμένα. Η FRA10AC1 παρουσιάζεται με κόμβο κόκκινου χρώματος. Οι κόμβοι με κίτρινο χρώμα αναπαριστούν πρωτεΐνες που έχουν απομονωθεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής. Με κόμβο λαδί χρώματος παρουσιάζεται η U2AF1L5 η οποία, σύμφωνα με τη UniProt, συμμετέχει στο σωματίο συναρμογής, αλλά δεν έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό του (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Με κόμβο μπλε χρώματος παρουσιάζονται πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε λειτουργίες εκτός του σωματίου συναρμογής. Με κόμβο γκρι χρώματος παρουσιάζεται η C7orf25 που έχει άγνωστη λειτουργία.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι κλώνοι κυττάρων που είχαν παρασκευαστεί από προκαταρκτικά πειράματα φέρουν έλλειμα στο διαγονίδιο *FRA10AC1*

Οι αντιδράσεις PCR και η αλληλούχηση του πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων *HeLa* έδειξε ότι υπήρχε έλλειμα στο διαγονίδιο *FRA10AC1*. Το πλασμίδιο πριν χρησιμοποιηθεί για τη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηρίων *E. Coli* dH5A rec (-), στα οποία το γονίδιο *RecA*, που είναι υπεύθυνο για τον ομόλογο ανασυνδυασμό, δεν είναι λειτουργικό. Τα στελέχη αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα, ώστε να διασφαλίζεται η ακεραιότητα των εξωχρωμοσωμικών τμημάτων DNA, όπως τα πλασμίδια. Αν δημιουργηθεί βλάβη στο DNA κατά την αντιγραφή, η *RecA* μπορεί να το επισκευάσει χρησιμοποιώντας ένα (θεωρητικά) μη κατεστραμμένο αντίγραφο. Ωστόσο, αφαιρείται από τα στελέχη που χρησιμοποιούνται για κλωνοποίηση, επειδή μπορεί μέσω του ανασυνδυασμού να δημιουργήσει έλλειμα στο πλασμίδιο ή να οδηγήσει σε ανασυνδυασμό με το βακτηριακό χρωμόσωμα (Chen, et al., 2008).

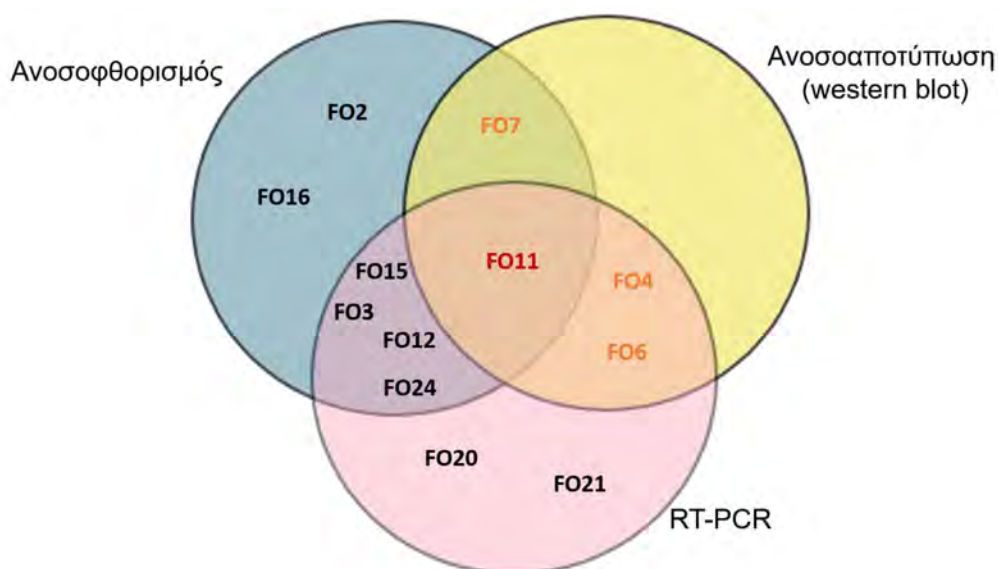
Ο έλεγχος της έκφρασης του *FRA10AC1* στους κλώνους είχε δείξει υπερέκφραση και σε επίπεδο mRNA (RT-PCR) και σε επίπεδο πρωτεΐνης (ανοσοεντοπισμός). Αυτό δικαιολογείται από το μήκος του ελλείματος (33 bp), το οποίο δεν επηρεάζει το πλαίσιο ανάγνωσης κατά τη μετάφραση (Εικόνα 59). Το έλλειμα οδηγούσε σε ελλιπή μετάφραση τμήματος του πλασμιδίου και 5 αμινοξέων από το διαγονίδιο. Παρότι το πλαίσιο ανάγνωσης δε μεταβάλλεται και το έλλειμα είναι σχετικά μικρό, δεν μπορούμε να γνωρίζουμε τι επιπτώσεις θα έχει αυτό στη λειτουργικότητα της παραγόμενης χιμαιρικής πρωτεΐνης. Έτσι, τυχόν διαφορές που θα εντοπιστούν στο φαινότυπο δεν μπορούν να αποδοθούν με σιγουριά στην υπερέκφραση της *FRA10AC1*.



Εικόνα 59: Εικόνες από τον ανοσοεντοπισμό της πρωτεΐνης FRA10AC1 σε κύτταρα ελέγχου *HeLa wt* και *HeLa-pcDNA* και στον κλώνο κυττάρων *HeLa-FRAover#25*. Στην πρώτη στήλη παρατηρείται ο φθορισμός του πυρήνα μετά από χρώση με τη φθορίζουσα χρωστική DAPI. Στην τρίτη στήλη με κόκκινο χρώμα διακρίνεται ο φθορισμός της πρωτεΐνης FRA10AC1 στον πυρήνα των κυττάρων, μετά από ανοσοεντοπισμό με ειδικό αντίσωμα. Στη μεσαία παρουσιάζεται η ένωση των δύο εικόνων. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο LeicaTSPSP5. Πηγή: Ουλιάννα Ιβάντσικ, Πτυχιακή εργασία, 2017

Αναπτύχθηκαν κλώνοι κυττάρων *HeLa* που υπερεκφράζουν σταθερά το *FRA10AC1*

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης αναπτύχθηκαν και ελέγχθηκαν ποιοτικά κλώνοι κυττάρων *HeLa* που υπερεκφράζουν το *FRA10AC1*. Για τον έλεγχο της υπερέκφρασης σε επίπεδο mRNA εφαρμόστηκε RT-PCR και σε επίπεδο πρωτεΐνης ανοσοεντοπισμός και ανοσοαποτύπωση. Σε επίπεδο mRNA αυξημένη έκφραση του διαγονιδίου παρουσίασαν οι κλώνοι FO#3, FO#12, FO#15, FO#20, FO#21 και FO#24. Στην τεχνική του ανοφορισμού οι κλώνοι FO#2, FO#3, FO#12, FO#15, FO#16 και FO#24 έδειξαν εντονότερο φθορισμό του πυρήνα από τα κύτταρα ελέγχου *HeLa* Kyoto και *HeLa*-pcDNA, υποδεικνύοντας υπερέκφραση της *FRA10AC1*. Από τους επιλεγμένους κλώνους στους οποίους ελέγχθηκε η υπερέκφραση της *FRA10AC1* με ανοσοαποτύπωση, υπερέκφραση της *FRA10AC1* παρουσίασαν οι κλώνοι κυττάρων FO#4, FO#6, FO#7 και FO#11 (Εικόνα 60).



Εικόνα 60: Οι κλώνοι κυττάρων που παρουσίασαν αυξημένη έκφραση του *FRA10AC1* σε επίπεδο mRNA βάσει της τεχνικής RT-PCR και σε επίπεδο πρωτεΐνης βάσει των πειραμάτων ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης. Με κόκκινο σημειώνεται ο κλώνος FO#11 που παρουσίασε αυξημένη έκφραση του *FRA10AC1* και στις τρεις τεχνικές. Με πορτοκαλί χρώμα σημειώνονται οι κλώνοι FO#4, FO#6 και FO#7 που παρουσίασαν αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης στην τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, που θεωρείται η πιο αξιόπιστη.

Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται ανάμεσα στους κλώνους που παρουσιάζουν υπερέκφραση του *FRA10AC1* σε κάθε τεχνική οφείλονται στο γεγονός ότι οι τεχνικές αυτές είναι ημιποσοτικές και έχουν μεγάλο ποσοστό πειραματικών σφαλμάτων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές, ώστε να εξαχθεί πιο αξιόπιστο

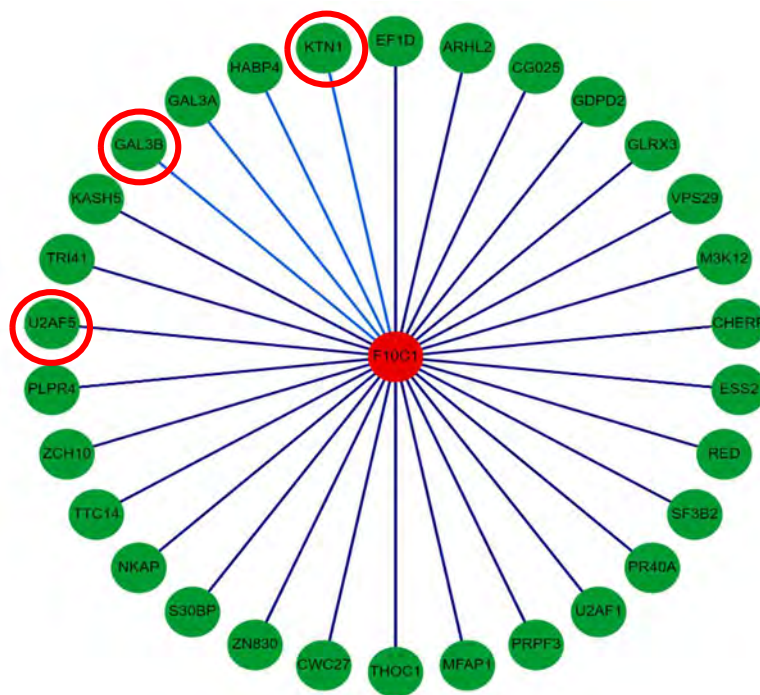
συμπέρασμα. Επιπλέον, το επίπεδο έκφρασης του mRNA δεν καθορίζει άμεσα τη συγκέντρωση της παραγόμενης πρωτεΐνης, καθώς υπάρχουν πολλοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί που καθορίζουν το ρυθμό μετάφρασης και μετέπειτα τη διάρκεια ζωής του πολυπεπτιδίου. Η πιο αξιόπιστη τεχνική αξιολόγησης της υπερέκφρασης είναι αυτή της ανοσοαποτύπωσης, γιατί αξιολογεί τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης, δηλαδή του λειτουργικού μορίου, ενώ συγκρίνεται άμεσα η συγκέντρωσή της στα διάφορα δείγματα.

Ο κλώνος FO#11 παρουσίασε υπερέκφραση της FRA10AC1 και στις τρεις τεχνικές. Οι κλώνοι κυττάρων FO#4 και FO#6 έδειξαν υπερέκφραση σε επίπεδο mRNA και στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης σε επίπεδο πρωτεΐνης και ο κλώνος FO#7 στην ανοσοαποτύπωση και στον ανοσοφθορισμό (Εικόνα 60). Οι κλώνοι αυτοί θεωρούνται κατάλληλοι για περαιτέρω αξιολόγηση των επιπτώσεων της υπερέκφρασης στη φυσιολογία των κυττάρων.

Επικαιροποίηση και διερεύνηση του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1

Για την ανακατασκευή του δικτύου άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με βάση το πρόσφατο δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του ανθρώπου έγινε αναζήτηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 στην PICKLE 2.5, η οποία περιλαμβάνει 1000 περισσότερους κόμβους και 30.000 παραπάνω αλληλεπιδράσεις σε σχέση με την PICKLE 2.2, βάσει της οποίας είχε ανακατασκευαστεί αρχικά το δίκτυο της FRA10AC1. Σύμφωνα με τα νέα δεδομένα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της PICKLE 2.5, η FRA10AC1 αλληλεπιδρά με ακόμη τρεις πρωτεΐνες, τις GAL3B, U2AF5 και KTN1 (Εικόνα 61). Οι αλληλεπιδράσεις με τις GAL3B και KTN1 είναι αξιοπιστίας 2, αφού έχουν προκύψει από πειράματα συγκρυστάλλωσης και πολλαπλό σύστημα δύο υβριδίων, αντίστοιχα.

Εκτός από την παρουσία τριών επιπλέον κόμβων, το δίκτυο τώρα περιλαμβάνει και 17 επιπλέον αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρώτων γειτόνων της FRA10AC1, δημιουργώντας ένα πιο πυκνό δίκτυο. Μάλιστα, οι αλληλεπιδράσεις αυτές αφορούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του σωματίου συναρμογής, οι οποίες στο νέο δίκτυο σχηματίζουν ένα ακόμη πιο στενά συνδεδεμένο δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 61: Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 σε επίπεδο UniProt ID από την PICKLE 2.5. Με κόκκινο πλαίσιο σημειώνονται οι GAL3B, U2AF5 και KTN1 που δεν υπήρχαν ως καταχωρημένες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της FRA10AC1 στην PICKLE 2.2, βάσει της οποίας είχε κατασκευαστεί το αρχικό δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1.

Το γονίδιο *U2AF1L5* παράγει την ίδια πρωτεΐνη με το *U2AF1* και η τελευταία έκδοση της βάσης δεδομένων UniProt αποδίδει σε καθένα από τα δύο αυτά γονίδια και τα δύο UniProt IDs. Στα πλαίσια του δικτύου άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1, οι δύο πρωτεΐνες παρουσιάζουν τις ίδιες αλληλεπιδράσεις. Ωστόσο, διερευνώντας τις αλληλεπιδράσεις των δύο πρωτεϊνών στη μετα-βάση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων PICKLE 2.5, παρατηρείται ότι οι U2AF1 και U2AF5 αλληλεπιδρούν με 43 κοινούς πρώτους γείτονες και για την U2AF5 έχουν ταυτοποιηθεί 11 επιπλέον αλληλεπιδράσεις. Δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες που παράγονται από τα δύο γονίδια έχουν ταυτόσημη αμινοξική αλληλουχία, στην πράξη είναι αδύνατο να ξεχωρίσουν ποια από τις δύο πρωτεΐνες συμμετέχει στην αλληλεπίδραση. Πιθανότατα, οι διαφορές οφείλονται σε υποκειμενική ονοματοδότηση από την ερευνητική ομάδα που ταυτοποίησε τις αλληλεπιδράσεις, ανάλογα με το γονίδιο που μελετά.

Επιπλέον, ενώ και οι δύο πρωτεΐνες αποδίδονται ως συστατικά του σωματίου συναρμογής, στα βιοχημικά πειράματα απομόνωσης και ταυτοποίησης των συστατικών του σωματίου συναρμογής και των επιμέρους συμπλόκων του αναφέρεται μόνο η U2AF1. Πιθανότατα, ένα μέρος των πεπτιδίων να προέρχεται από την έκφραση

του *U2AF1L5*, ωστόσο, να μην μπόρεσαν να τα διαχωρίσουν από αυτά που παράγονται από το *U2AF1*. Αναζητώντας σε ποια σύμπλοκα του σωματίου συναρμογής έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό η U2AF5, στις βάσεις δεδομένων GeneCards και Kegg βρέθηκε ότι αποτελεί συστατικό των συμπλόκων A, B και C, ενώ η U2AF1 έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό των συμπλόκων E, A, B και B-act (Πίνακας 12). Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται στις πληροφορίες σχετικά με τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και τη συμμετοχή των δύο πρωτεϊνών σε διαφορετικά σύμπλοκα του σωματίου συναρμογής χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Η GAL3B, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων UniProt, αντιστοιχίζεται στο ίδιο Gene ID με αυτό της GAL3A, αλλά οι βάσεις γονιδιωματικών δεδομένων (όπως η GenBank) της αποδίδουν διαφορετικό Gene ID. Αυτές οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται ανάμεσα στις βάσεις δεδομένων δημιουργούνται λόγω ανοιχτών ακόμα ζητημάτων στην επισημείωση του ανθρώπινου γονιδιώματος και πρωτεϊνώματος.

Η FRA10AC1, σύμφωνα με το δίκτυο άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεών της, αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του σωματίου συναρμογής, παράγοντες που συμμετέχουν στη μεταγραφή και τη μετάφραση, πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό και τον κυτταρικό κύκλο και πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των κυττάρων. Οι λειτουργίες αυτές συμβαδίζουν απόλυτα με τις λειτουργίες που βρέθηκε ότι διαταράσσονται μετά από καταστολή της έκφρασης της FRA10AC1 (Papadimitropoulos, et al., 2019).

Η FRA10AC1 αποτελεί πυρηνική πρωτεΐνη, ωστόσο, διερευνώντας την υποκυττάρια θέση των μελών του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεών της, παρατηρείται ότι κάποιες πρωτεΐνες δεν εντοπίζονται στον πυρήνα. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να συμβαίνει σε περιόδους που η πυρηνική μεμβράνη του κυττάρου έχει διαλυθεί, όπως συμβαίνει κατά τη μίτωση. Επίσης, η PLPPR4 είναι μεμβρανική πρωτεΐνη και μπορεί να βρίσκεται και στην πυρηνική μεμβράνη και έτσι να αλληλεπιδρά με τη FRA10AC1. Οι VPS29 και KTN1 συμμετέχουν στη μεταφορά κυστιδίων και είναι πιθανό να αλληλεπιδρούν με τη FRA10AC1 κατά τη μεταφορά κυστιδίων από και προς τον πυρήνα. Η GDPD2, που δεν εντοπίζεται στον πυρήνα, συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση της ακτίνης, επομένως είναι πιθανό να αλληλεπιδρά με τη FRA10AC1 κατά τη μίτωση, όπου διαλύεται η πυρηνική μεμβράνη. Η MAP3K12 αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες, επηρεάζοντας τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων. Η πρωτεΐνη αυτή δεν εντοπίζεται στον πυρήνα, αλλά η FRA10AC1 σχετίζεται με ασθένειες που επηρεάζουν τα νευρικά κύτταρα, όπως είναι η εύθραυστη θέση *FRA10A*

(Σαραφίδου, Διδακτορική διατριβή, 2004), το Alzheimer's και η σχιζοφρένεια (GWAS catalogue, Buniello, et al, 2019).

Εκτός αυτού, η FRA10AC1 μπορεί να βρίσκεται και σε άλλα υποκυττάρια διαμερίσματα, αλλά σε πολύ μικρή συγκέντρωση και για αυτό να μην έχει εντοπιστεί. Αντίστοιχα, τα μέλη του δικτύου της FRA10AC1 που δεν εντοπίζονται στον πυρήνα μπορεί να βρίσκονται παροδικά εκεί ή σε πολύ μικρή συγκέντρωση και να μην έχουν εντοπιστεί. Επιπλέον, δε θα πρέπει να ξεχνάμε ότι οι τεχνικές που εφαρμόζονται για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων περιλαμβάνουν την ταυτόχρονη παρουσία των δύο μορίων. Επομένως, τα δύο μόρια μπορεί να έχουν περιοχές που δυνητικά θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους, αλλά στο κύτταρο να μη συμβαίνει αυτή η αλληλεπίδραση, διότι τα μόρια δεν έρχονται ποτέ σε επαφή.

Αντίστοιχο πρόβλημα παρατηρείται και στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις πρωτεΐνες του σωματίου συναρμογής. Τα ζεύγη πρωτεϊνών FRA10AC1-SAP30BP, SAP30BP-THOC1, NKAP-U2AF1 και U2AF1-ZCCHC10, για τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί άμεσες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, δε συναντώνται στα ίδια σύμπλοκα του σωματίου συναρμογής (Πίνακας 11). Βέβαια, οι SAP30BP και THOC1, NKAP και U2AF1 και U2AF1 και ZCCHC10 συμμετέχουν σε διαδοχικά σύμπλοκα και έτσι μπορεί να αλληλεπιδρούν κατά τη μετάβαση από το ένα σύμπλοκο στο άλλο. Οι FRA10AC1 και SAP30BP δε συμμετέχουν ούτε σε κοινά ούτε σε διαδοχικά σύμπλοκα, αλλά μπορεί να αλληλεπιδρούν στα πλαίσια μιας άλλης λειτουργίας, εκτός του σωματίου συναρμογής.

Μάλιστα, η SAP30BP αλληλεπιδρά και με άλλες πρωτεΐνες που δεν έχουν εντοπιστεί στα σύμπλοκα συναρμογής E και A που συμμετέχει αυτή, όπως είναι οι DHX8 και TFIP11 που συμμετέχουν στα σύμπλοκα B, B-act, C και P και η WDR83 που συμμετέχει στα σύμπλοκα B, B-act και C.

Μελετώντας το δίκτυο παρατηρείται ότι οι πρωτεΐνες του σωματίου συναρμογής σχηματίζουν ένα επιμέρους δίκτυο, αφού αλληλεπιδρούν στενά μεταξύ τους, εκτός από τη CWC27 που αλληλεπιδρά μόνο με τη FRA10AC1. Η CWC27 έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό του σωματίου συναρμογής, χωρίς να έχει αποσαφηνιστεί ο ακριβής ρόλος της σε αυτό. Μάλιστα, η CWC27 αλληλεπιδρά μόνο με δύο συστατικά του σωματίου συναρμογής, τη FRA10AC1 και τη CLK1.

Τα μέλη του δικτύου που δε συμμετέχουν στο σωματίο συναρμογής συνδέονται με το δίκτυο μόνο μέσω της FRA10AC1, εκτός από τις C7orf25 και TRIM41 που εμπλέκονται στο επιμέρους δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων των μελών του

σωματίου συναρμογής. Η TRIM41 αλληλεπιδρά με εννέα πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη συναρμογή (FRA10AC1, MFAP1, SRPK2, BYSL, ZNF207, CSNK2A1, PRPF31, RNPS1, HSP90AA1) υποδεικνύοντας ότι συνδέεται στενά με αυτό.

Διερεύνηση των μεταγραφικών προτύπων των πρώτων γειτόνων της FRA10AC1

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τους πρώτους γείτονες της FRA10AC1 παρουσιάζουν σημαντική διαφοροποίηση στα επίπεδα έκφρασης στους διάφορους ιστούς. Υπάρχουν λίγα γονίδια που παρουσιάζουν υψηλή έκφραση σε όλους τους ιστούς, ενώ η πλειονότητα έχει μικρά επίπεδα έκφρασης στους περισσότερους ιστούς. Αυτό επιβεβαιώνεται από τις διάμεσες τιμές έκφρασης των γονιδίων, οι οποίες δείχνουν μία διαφορά τεσσάρων τάξεων μεγέθους μεταξύ του *SF3B2* με διάμεση τιμή έκφρασης 109 και του *KASH5* που έχει τιμή έκφρασης μικρότερη του 0.1 σε όλους τους ιστούς, εκτός από τους όρχεις και την παρεγκεφαλίδα. Το FRA10AC1 έχει μία μέση τιμή έκφρασης περίπου 10 και βρίσκεται στη μέση της κλίμακας μέσης έκφρασης των 31 γονιδίων. Σημειώνεται, επίσης, ότι η μέση τιμή γονιδιακής έκφρασης των συστατικών του σωματίου συναρμογής κυμαίνεται σε όλες τις τάξεις μεγέθους γονιδιακής έκφρασης. Η διαφοροποίηση αυτή πιθανότατα οφείλεται στη διαφορετική στοιχειομετρία με την οποία συμμετέχει κάθε πρωτεΐνη στο σωματίο συναρμογής. Επιπλέον, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τμήμα των παραγόμενων πολυπεπτιδίων κάποιων πρωτεϊνών συμμετέχουν και σε άλλες διεργασίες εκτός του σωματίου συναρμογής και για αυτό μπορεί να παρατηρείται αυξημένη έκφρασή τους σε σχέση με άλλες πρωτεΐνες που λειτουργούν μόνο ως παράγοντες συναρμογής.

Σύμφωνα με την ιεραρχική ομαδοποίηση βάσει Ευκλείδειας απόστασης, το *FRA10AC1* ομαδοποιείται με τα γονίδια *ZCCHC10*, *C7orf25*, *GATD3B* και *NKAP* (Εικόνα 54). Η Μέθοδος Αναγνώρισης Προτύπων του Παυλίδη ταυτοποίησε οκτώ γονίδια με προφίλ έκφρασης στους διάφορους ιστούς με στατιστική ομοιότητα με αυτό του *FRA10AC1* (R) μεγαλύτερη από 70%. Τη μεγαλύτερη ομοιότητα ως προς το προφίλ έκφρασης παρουσιάζει το *NKAP* με ομοιότητα R 91% (Εικόνα 57). Το *NKAP* ομαδοποιείται με το *FRA10AC1* και βάσει Ευκλείδειας απόστασης και βάσει της Μεθόδου Αναγνώρισης Προτύπων του Παυλίδη, υποδεικνύοντας την πιθανή ύπαρξη ενός κοινού ρυθμιστικού μηχανισμού, άρα και την πιθανή συμμετοχή των παραγόμενων πρωτεϊνών σε κοινές λειτουργίες.

Οι επτά από τις οκτώ πρωτεΐνες που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική ομοιότητα του προτύπου έκφρασης με το *FRA10AC1* έχουν ταυτοποιηθεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής, υποστηρίζοντας το ρόλο και της *FRA10AC1* ως συστατικό του. Ανάμεσα στα γονίδια είναι και το *SF3B2*, το οποίο παρουσιάζει την υψηλότερη διάμεση τιμή έκφρασης στους ιστούς. Η *SF3B2* αποτελεί κεντρική πρωτεΐνη του σωματίου συναρμογής και έχει απομονωθεί ως συστατικό όλων των επιμέρους συμπλόκων. Επιπλέον, μεταξύ των γονιδίων που παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα στο μοτίβο έκφρασης μεταξύ των ιστών με αυτό του *FRA10AC1* είναι ότι το *SAP30BP*, που με βάση τα βιοχημικά πειράματα απομόνωσης συστατικών του σωματίου συναρμογής δείξαμε ότι δε συναντώνται σε κοινά σύμπλοκα του σωματίου συναρμογής, ενώ οι δύο πρωτεΐνες δεν έχουν ταυτοποιηθεί ούτε σε διαδοχικά σύμπλοκα (Πίνακας 12). Η αλληλεπίδραση της *FRA10AC1* με τη *SAP30BP* μπορεί να συμβαίνει στα πλαίσια μιας άλλης διεργασίας εκτός της συναρμογής ή μπορεί οι πρωτεΐνες να συμμετέχουν και σε άλλα σύμπλοκα του σωματίου, λόγω όμως της μικρής συγκέντρωσής τους ή της ασθενούς σύνδεσής με αυτά να μην μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν.

Η κατασκευή του άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της *FRA10AC1* βάσει της στατιστικής ομοιότητας που παρουσιάζουν τα προφίλ έκφρασης των γονιδίων στους διάφορους ιστούς επιβεβαιώνει τη στενή συσχέτιση των πρωτεϊνών του σωματίου συναρμογής, οι οποίες βρίσκονται πολύ κοντά στο δίκτυο, δείχνοντας ότι η έκφρασή τους ρυθμίζεται από έναν κοινό μηχανισμό, εκτός από τη *CWC27*. Επίσης, κοντά στο δίκτυο που σχηματίζεται από τις πρωτεΐνες του σωματίου συναρμογής βρίσκονται και οι *TRIM41*, *GDPD2* και *C7orf25*, υποδεικνύοντας πιθανή συσχέτιση με το σωματίο συναρμογής (Εικόνα 58). Συνολικά, μέσα και από αυτή την ανάλυση, υποστηρίζεται ο ρόλος της *FRA10AC1* ως συστατικό του σωματίου συναρμογής, ενώ αναδεικνύονται και στοιχεία για την άγνωστη λειτουργία *C7orf25* και τη διασύνδεση της *FRA10AC1* με τη *SAP30BP*, που απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση μέσω και ποσοτικών δεδομένων και λειτουργικών πειραμάτων σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της *FRA10AC1* παρουσιάζει σημαντική ιστοειδικότητα

Η ανακατασκευή των δικτύων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων ανά ιστό, ορίζοντας το μέγεθος των κόμβων ανάλογο της έκφρασης κάθε πρωτεΐνης, έδωσε τη δυνατότητα μιας πιο ρεαλιστικής αναπαράστασης του δικτύου. Τα στατικά δίκτυα με ενιαίο

μέγεθος κόμβων δεν αντιπροσωπεύουν πλήρως την πραγματικότητα σχετικά με τις αφθονίες των μορίων ή τη χρονική σχέση. Για παράδειγμα, μπορεί να μη συμμετέχουν ταυτόχρονα όλες οι πρωτεΐνες στο δίκτυο και το δίκτυο να αλλάζει από στιγμή σε στιγμή, στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια και στους ιστούς.

Τα δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που διαφοροποιούνται περισσότερο από τους άλλους ιστούς είναι αυτά των όρχεων και του σπλήνα. Στους όρχεις παρουσιάζονται οι μεγαλύτερες τιμές έκφρασης των μελών του δικτύου της *FRA10AC1*. Στον ιστό αυτό εντοπίζονται πολλά εναλλακτικά μετάγραφα γονιδίων που δεν εκφράζονται σε άλλους ιστούς (Xu, et al., 2002). Επιπλέον, στους όρχεις έχουν εντοπιστεί τρία επιπλέον εναλλακτικά μετάγραφα (3,4,5) του *FRA10AC1*. Καθώς η *FRA10AC1* φαίνεται να παίζει ρόλο στην αναγνώριση εναλλακτικών θέσεων συναρμογής (Lin, et al., 2018), η ύπαρξη επιπλέον ισομορφών στον ιστό αυτό πιθανότατα συμβάλλει στην παραγωγή εναλλακτικών μεταγράφων και από άλλα γονίδια. Η *FRA10AC1* αλληλεπιδρά και με τις *ESS2* και *IK*, των οποίων ο ρόλος είναι η αναγνώριση εναλλακτικών θέσεων συναρμογής. Τα *ESS2* και *IK* παρουσιάζουν την υψηλότερη τιμή έκφρασης στην ουρήθρα και στους όρχεις, γεγονός που υποστηρίζει το ρόλο των παραγόμενων πρωτεϊνών στην παραγωγή επιπλέον ισομορφών από άλλα γονίδια. Μάλιστα, το *IK* είναι το γονίδιο που εκφράζεται εντονότερα στον ιστό των όρχεων από όλα τα μέλη του μελετώμενου δικτύου. Για να διερευνηθεί, επομένως, ο ρόλος της *FRA10AC1* και των εναλλακτικών μεταγράφων της προτείνεται η διερεύνηση της υπόθεσης ότι η *FRA10AC1* παίζει ρόλο στην αναγνώριση εναλλακτικών θέσεων συναρμογής στον άνθρωπο και σε άλλα είδη.

Διεύρυνση του δικτύου της *FRA10AC1* με δεδομένα από ορθόλογες πρωτεΐνες

Θεωρώντας ότι αν δύο πρωτεϊνικά μόρια αλληλεπιδρούν σε έναν οργανισμό, τότε είναι πιθανό να αλληλεπιδρούν και τα ορθόλογά τους, τότε η *FRA10AC1* είναι πιθανό να αλληλεπιδρά επιπλέον με τις πρωτεΐνες *SPSB4*, *RPL30*, *RPS14* και *XPO1*. Η *SPSB4* αποτελεί μόριο αναγνώρισης της λιγάσης E3 (Nishiya, et al., 2011; Kamura, et al., 2004), λειτουργία που επιτελεί η *TRIM41* που είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με τη *FRA10AC1* (Tanaka, et al., 2005). Επομένως, είναι πιθανό η *FRA10AC1* να εμπλέκεται στη λειτουργία της ουβικιτινοποίησης και στα πλαίσια αυτής της διεργασίας να αλληλεπιδρά με την *TRIM41* και τη *SPSB4*.

Οι RPL30 και RPS14 αποτελούν ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Η FRA10AC1 είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με τις HABP4 και EEF1D που συμμετέχουν στη μετάφραση (Nery, et al., 2004; Nery, et al., 2006; Bressan, et al., 2009; Goncalves, et al., 2011; Kaitsuka, et al., 2011), ενώ και η ομική ανάλυση των κλώνων κυττάρων καταστολής του *FRA10AC1* έδειξε διαταραχή της λειτουργίας της μετάφρασης (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018, Papadimitropoulos, et al, 2019), υποδεικνύοντας πιθανή συμμετοχή της FRA10AC1 σε αυτή.

Η XPO1 είναι υπεύθυνη για την έξοδο RNAs και πρωτεϊνών από τον πυρήνα (Boulon, et al., 2004, Fornerod, et al., 1997, Ossareh-Nazari, et al., 1997), λειτουργία όμοια με αυτή της THOC1 (Song, et al., 2013) που αλληλεπιδρά η FRA10AC1. Όπως παρατηρείται, όλες οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά η FRA10AC1 σε άλλους οργανισμούς συμμετέχουν σε λειτουργίες κοινές με τους ήδη γνωστούς γείτονές της στον άνθρωπο. Προτείνεται, επομένως, ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις πρωτεΐνες αυτές και στον άνθρωπο.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης αναπτύχθηκαν και μελετήθηκαν ποιοτικά κλώνοι κυττάρων *HeLa* που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση της FRA10AC1 σε σχέση με κύτταρα *HeLa* αγρίου τύπου. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης στη φυσιολογία των κυττάρων, χρησιμοποιώντας συνδυαστικές ομικές αναλύσεις.

Χρησιμοποιώντας εργαλεία βιοπληροφορικής, έγινε επικαιροποίηση και μελέτη του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1. Η FRA10AC1 αλληλεπιδρά με 30 πρωτεΐνες, εκ των οποίων οι 16 αποτελούν συστατικά του σωματίου συναρμογής. Επιπλέον, βρέθηκαν πιθανές αλληλεπιδράσεις με ακόμη 4 πρωτεΐνες, βάσει δεδομένων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων από ορθόλογα μόρια. Η εφαρμογή πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης έδειξε ότι το *FRA10AC1* παρουσιάζει πολύ όμοιο πρότυπο έκφρασης με το *NKAP*, υποδεικνύοντας την πιθανή ύπαρξη ενός κοινού ρυθμιστικού μηχανισμού και την πιθανή συμμετοχή των παραγόμενων πρωτεϊνών σε κοινές λειτουργίες.

Το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 παρουσιάζει σημαντική ιστοειδικότητα, με τον ιστό των όρχεων να διαφοροποιείται σημαντικά από τους υπολοίπους. Οι όρχεις είναι ένας ιστός που απαιτεί πολύ λεπτή ρύθμιση για να επιτευχθεί η παραγωγή και διαφοροποίηση των γαμετικών κυττάρων. Το γεγονός αυτό συνάδει με την υπόθεση ότι η FRA10AC1 παίζει ρόλο στην αναγνώριση εναλλακτικών θέσεων συναρμογής, όπως φαίνεται από το ρόλο της στο *Chlamydomonas reinhardtii*. Επίσης, η ύπαρξη επιπλέον εναλλακτικών μεταγράφων στους όρχεις μπορεί να συμβάλλει στην παραγωγή εναλλακτικών μεταγράφων και από άλλα γονίδια, συμβάλλοντας στη λεπτή ρύθμιση που απαιτείται στον ιστό αυτό. Η βιοπληροφορική ανάλυση έδωσε σημαντικές κατευθύνσεις όσον αφορά τη μελέτη που πρέπει να ακολουθήσει για να αποσαφηνιστεί ο βιοχημικός ρόλος της FRA10AC1.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Bai S.W., Herrera-Abreu M.T., Rohn J.L., Racine V., Tajadura V., et al. Identification and characterization of a set of conserved and new regulators of cytoskeletal organisation, cell morphology and migration. *BMC Biol.* 9:54-54(2011)
- Barabási, A.-L., & Oltvai, Z. N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature Reviews Genetics*, 5(2), 101–113.
- Barbas CF 3rd, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. Quantitation of DNA and RNA. *CSH Protoc.* 2007 Nov 1;2007:pdb.ip47.
- Barrow KM, Perez-Campo FM, Ward CM. Use of the cytomegalovirus promoter for transient and stable transgene expression in mouse embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 2006;329:283-94.
- Boulon S, Verheggen C, Jady BE, et al. PHAX and CRM1 are required sequentially to transport U3 snoRNA to nucleoli. *Mol Cell.* 2004;16(5):777-787.
- Braeuer A.U., Savaskan N.E., Kuehn H., Prehn S., Ninnemann O., Nitsch R. A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting. *Nat. Neurosci.* 6:572-578(2003)
- Brendan P. Lucey, Walter A. Nelson-Rees, and Grover M. Hutchins (2009) Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*: September 2009, Vol. 133, No. 9, pp. 1463-1467.
- Bressan G.C., Quaresma A.J., Moraes E.C., Manfiolli A.O., Passos D.O., Gomes M.D., Kobarg J. Functional association of human Ki-1/57 with pre-mRNA splicing events. *FEBS J.* 276:3770-3783(2009)
- Brody, J.R.; Kern, S.E. (2004). History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Anal Biochem.* 333 (1): 1–13.
- Buniello A, MacArthur JAL, Cerezo M, Harris LW, Hayhurst J, et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Research*, 2019, Vol. 47 (Database issue): D1005-D1012.
- Capriotti T. HIV/AIDS: An Update for Home Healthcare Clinicians. *Home Healthc Now.* 2018 Nov/Dec;36(6):348-355.
- Carithers, L. J., & Moore, H. M. (2015). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project. *Biopreservation and biobanking*, 13(5), 307–308.
- Chen D., Gould C., Garza R., Gao T., Hampton R.Y., Newton A.C. Amplitude control of protein kinase C by RINCK, a novel E3 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 282:33776-33787(2007)
- Chen D, Li Z, Yang Q, Zhang J, Zhai Z, Shu HB. Identification of a nuclear protein that promotes NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;310(3):720-724.
- Chen, Z.; Yang, H.; Pavletich, N. P. (2008). Mechanism of homologous recombination from the RecA–ssDNA/dsDNA structures. *Nature.* 453 (7194): 489–4.

Cheng, S.; Fockler, C.; Barnes, W. M.; Higuchi, R. (1994). Effective Amplification of Long Targets from Cloned Inserts and Human Genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91 (12): 5695–5699.

Chong HY, Teoh SL, Wu DB, Kotirum S, Chiou CF, Chaiyakunapruk N. Global economic burden of schizophrenia: a systematic review. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2016;12:357-73.

Chung, J., Wang, X., Maruyama, T., Ma, Y., Zhang, X., et al. (2018). Genome-wide association study of Alzheimer's disease endophenotypes at prediagnosis stages. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 14(5), 623–633.

Clancy, S. (2008) RNA splicing: introns, exons and spliceosome. *Nature Education* 1(1):31

Coletta, A., Pinney, J.W., Solis, D.Y., Marsh, J., Pettifer, S.R., Attwood, T.K. (2010). Low-complexity regions within protein sequences have position-dependent roles. *BMC Systems Biology*, 4 (43)

Cox, R. A. (1968). [103a] The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. *Nucleic Acids, Part B*, 120–129.

Cretu C, Schmitzová J, Ponce-Salvatierra A, et al. Molecular Architecture of SF3b and Structural Consequences of Its Cancer-Related Mutations. *Mol Cell*. 2016;64(2):307-319.

Crosby, M., et al. (2007). FlyBase: Genomes by the Dozen. *Nucleic Acids Research. Oxford Journals*. 35: D486–D491.

Damen E, Krieger E, Nielsen JE, Eygensteyn J, van Leeuwen JE. The human Vps29 retromer component is a metallo-phosphoesterase for a cation-independent mannose 6-phosphate receptor substrate peptide. *Biochem J*. 2006;398(3):399-409.

Das R, Zhou Z, Reed R. Functional association of U2 snRNP with the ATP-independent spliceosomal complex E. *Mol Cell*. 2000;5(5):779-787.

Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. dbSNP accession: { rs116953792 }, (dbSNP Build ID: {153}). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

De I, Bessonov S, Hofele R, et al. The RNA helicase Aquarius exhibits structural adaptations mediating its recruitment to spliceosomes. *Nat Struct Mol Biol*. 2015;22(2):138-144.

De Luca V, Tharmalingam S, Müller DJ, Wong G, de Bartolomeis A, Kennedy JL. Gene-gene interaction between MAOA and COMT in suicidal behavior: analysis in schizophrenia. *Brain Res*. 2006 Jun 30;1097(1):26-30.

Durkin SG, Glover TW. Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet*. 2007;41:169-92.

Florath I, Butterbach K, Müller H, Bewerunge-Hudler M, Brenner H. Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites. *Hum Mol Genet*. 2013;23:1186–1201.

Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*. 1997;90(6):1051-1060.

Galliopoulou E., et al. The protein-protein interaction network of the human spliceosome. *European Journal of Human Genetics*. Volume 23 Supplement 1 June 2015.

Galliopoulou E., et al. The human spliceosomal protein-protein interaction network. *The FEBS Journal*. Volume 282 Supplement 1 July 2015

Gaucher JF, Maugé C, Didry D, et al. Interactions of isolated C-terminal fragments of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) with actin and Arp2/3 complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012 Oct;287(41):34646-34659.

Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004 – [cited 2020 07 14]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

Genome Wide Association Studies. National Human Genome Research Institute, About Genomics, Talking Glossary of Genetic Terms. Retrieved: 22/3/2020

Gerhard DS, Wagner L, Feingold EA, et al. The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC) [published correction appears in *Genome Res*. 2006 Jun;16(6):804. Morrin, Ryan [corrected to Morin, Ryan]]. *Genome Res*. 2004;14(10B):2121-2127.

Gey, G. O. Some Aspects of the Constitution and Behavior of Normal and Malignant Cells in Continuous Culture. New York, NY: Academic Press; 1955. The Harvey Lectures, Series L, 1954–1955.

Ghosh, S. G., Becker, K., Huang, H., Dixon-Salazar, T., Chai, G., et al. Biallelic mutations in ADPRHL2, encoding ADP-ribosylhydrolase 3, lead to a degenerative pediatric stress-induced epileptic ataxia syndrome. *Am. J. Hum. Genet*. 103: 431-439, 2018.

Ghaderi, M., Sabahi, F., Sadeghi-Zadeh, M., Khanlari, Z., Jamaati, A., et al. (2014). Construction of an eGFP Expression Plasmid under Control of T7 Promoter and IRES Sequence for Assay of T7 RNA Polymerase Activity in Mammalian Cell Lines. *Iranian journal of cancer prevention*, 7(3), 137–141.

Gioutlakis A, Klapa MI, Moschonas NK. (2017). PICKLE 2.0: A human protein-protein interaction meta-database employing data integration via genetic information ontology. *PLoS ONE* 12(10): e0186039.

Giulia Antonazzo, Jose M Urbano, Steven J Marygold, Gillian H Millburn, Nicholas H Brown, Building a pipeline to solicit expert knowledge from the community to aid gene summary curation, *Database*, Volume 2020, 2020, baz152

Goncalves K.A., Bressan G.C., Saito A., Morello L.G., Zanchin N.I., Kobarg J. Evidence for the association of the human regulatory protein Ki-1/57 with the translational machinery. *FEBS Lett*. 585:2556-2560(2011)

Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.

Hammond, S., Bernstein, E., Beach, D. et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293–296 (2000).

Han H. RNA Interference to Knock Down Gene Expression. *Methods Mol Biol*. 2018;1706:293-302.

Hartung, B., Sampson, S., & Leucht, S. (2015). Perphenazine for schizophrenia. Cochrane Database of Systematic Reviews.

Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, et al. The DNA sequence of human chromosome 21 [published correction appears in Nature 2000 Sep 7;407(6800):110]. Nature. 2000;405(6784):311-319.

Haunhorst P., Hanschmann E.M., Brautigam L., Stehling O., Hoffmann B., Muhlenhoff U., Lill R., Berndt C., Lillig C.H. Crucial function of vertebrate glutaredoxin 3 (PICOT) in iron homeostasis and hemoglobin maturation. Mol. Biol. Cell 24:1895-1903(2013)

Hegele, A., Kamburov, A., Grossmann, A., Sourlis, C., Wowro, S., et al. (2012). Dynamic Protein-Protein Interaction Wiring of the Human Spliceosome. Molecular Cell, 45(4), 567–580.

Helling RB, Goodman HM, Boyer HW. Analysis of endonuclease R•EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. J. Virol. 1974;14:1235–1244.

Hermjakob, H., Montecchi-Palazzi, L., Lewington, C., Mudali, S., Kerrien, S., et al. (2004). IntAct: an open source molecular interaction database. Nucleic acids research, 32(Database issue), D452–D455.

HomoloGene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004 – [cited 2020 07 14]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>

Hu L., Yang F., Liu X., Xu D., Dai W. Nuclear protein IK undergoes dynamic subcellular translocation and forms unique nuclear bodies during the cell cycle. Biomark. Res. 1:11-11(2013)

Huttlin EL, Bruckner RJ, Paulo JA, et al. Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. Nature. 2017;545(7655):505-509.

Javadi S, Menias CO, Karbasian N, Shaaban A, Shah K, Osman A, Jensen CT, Lubner MG, Gaballah AH, Elsayes KM. HIV-related Malignancies and Mimics: Imaging Findings and Management. Radiographics. 2018 Nov-Dec;38(7):2051-2068.

Jiang, Y., Lucas, I., Young, D. J., Davis, E. M., Karrison, T., Rest, J. S., & Le Beau, M. M. (2009). Common fragile sites are characterized by histone hypoacetylation. Human molecular genetics, 18(23), 4501–4512.

Kaitsuka T, Tomizawa K, Matsushita M. Transformation of eEF1Bδ into heat-shock response transcription factor by alternative splicing. EMBO Rep. 2011;12(7):673-681.

Kamura T, Maenaka K, Kotoshiba S, et al. VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. Genes Dev. 2004;18(24):3055-3065.

Kanehisa, M; Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. Protein Sci. 28, 1947-1951 (2019)

Kaur, G., & Dufour, J. M. (2012). Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. Spermatogenesis, 2(1), 1–5.

Kirkbride JB, Errazuriz A, Croudace TJ, Morgan C, Jackson D, Boydell J, Murray RM, Jones PB. Incidence of schizophrenia and other psychoses in England, 1950-2009: a systematic review and meta-analyses. PLoS ONE. 2012;7(3):e31660.

Klapa MI, Tsafou K, Theodoridis E, Tsakalidis A, Moschonas NK. (2013). Reconstruction of the experimentally supported human protein interactome: what can we learn? *BMC Syst. Biol.* 7:96

Laplanche JM, O'Rourke F, Lu X, Fein A, Olsen A, Feinstein MB. Cloning of human Ca²⁺ homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP): regulated expression of antisense cDNA depletes CHERP, inhibits intracellular Ca²⁺ mobilization and decreases cell proliferation. *Biochem J.* 2000;348 Pt 1(Pt 1):189-199.

Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl.* 1993 May;2(4):275-87.

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (62), 3923.

Lehmann, D. S., Ribaud, H. J., Daar, E. S., Gulick, R. M., Haubrich, R. H., Robbins, G. K., de Bakker, P. I., Haas, D. W., & McLaren, P. J. (2015). Genome-wide association study of virologic response with efavirenz-containing or abacavir-containing regimens in AIDS clinical trials group protocols. *Pharmacogenetics and genomics*, 25(2), 51–59.

Letunic I and Bork P 20 years of the SMART protein domain annotation resource *Nucleic Acids Res* 2017

Li JF, Liu LD, Ma SH, et al. HTRP--an immediate-early gene product induced by HSV1 infection in human embryo fibroblasts, is involved in cellular co-repressors. *J Biochem.* 2004;136(2):169-176.

Li, Q. S., Parrado, A. R., Samtani, M. N., Narayan, V. A., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2015). Variations in the FRA10AC1 Fragile Site and 15q21 Are Associated with Cerebrospinal Fluid Aβ₁₋₄₂ Level. *PloS one*, 10(8), e0134000.

Lin, H., Zhang, Z., Iomini, C., & Dutcher, S. K. (2018). Identifying RNA splicing factors using *IFT* genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Open biology*, 8(3), 170211.

Liu, L. X., Liu, Z. H., Jiang, H. C., Zhang, W. H., Qi, S. Y., Hu, J., Wang, X. Q., & Wu, M. (2003). Gene expression profiles of hepatoma cell line *HLE*. *World journal of gastroenterology*, 9(4), 683–687.

Lukusa T, Fryns JP. Human chromosome fragility. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Jan;1779(1):3-16. Epub 2007 Dec 3.

Lutz, S. M., Cho, M. H., Young, K., Hersh, C. P., Castaldi, P. J., et al. (2015). A genome-wide association study identifies risk loci for spirometric measures among smokers of European and African ancestry. *BMC genetics*, 16, 138.

Maglott, D., Ostell, J., Pruitt, K. D., & Tatusova, T. (2011). Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic acids research*, 39(Database issue), D52–D57.

Manolio TA (2010). Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *The New England Journal of Medicine.* 363 (2): 166–76

Martínez-Gimeno M, Gamundi MJ, Hernan I, et al. Mutations in the pre-mRNA splicing-factor genes PRPF3, PRPF8, and PRPF31 in Spanish families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(5):2171-2177.

McDonald-McGinn DM, Sullivan KE, Marino B, et al. 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15071. Published 2015 Nov 19.

Messias EL, Chen CY, Eaton WW. Epidemiology of schizophrenia: review of findings and myths. *Psychiatr. Clin. North Am*. 2007 Sep;30(3):323-38.

Mucsi, Z. et al. Penicillin's catalytic mechanism revealed by inelastic neutrons and quantum chemical theory. *Phys Chem Chem Phys*. 15, 20447–20455

Nery F.C., Passos D.O., Garcia V.S., Kobarg J. Ki-1/57 interacts with RACK1 and is a substrate for the phosphorylation by phorbol 12-myristate 13-acetate-activated protein kinase C. *J. Biol. Chem*. 279:11444-11455(2004)

Nery F.C., Rui E., Kuniyoshi T.M., Kobarg J. Evidence for the interaction of the regulatory protein Ki-1/57 with p53 and its interacting proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 341:847-855(2006)

Nikfarjam, L., & Farzaneh, P. (2012). Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. *Cell journal*, 13(4), 203–212.

Nicolas G, Acuña-Hidalgo R, Keogh MJ, Quenez O, Steehouwer M, et al. Somatic variants in autosomal dominant genes are a rare cause of sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018 Dec;14(12):1632-1639.

Nilsen TW, Graveley BR 2010. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463: 457–463

Nishiya T, Matsumoto K, Maekawa S, et al. Regulation of inducible nitric-oxide synthase by the SPRY domain- and SOCS box-containing proteins. *J Biol Chem*. 2011;286(11):9009-9019.

Noma, K., Goncharov, A., & Jin, Y. (2014). Systematic analyses of rpm-1 suppressors reveal roles for ESS-2 in mRNA splicing in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 198(3), 1101–1115.

Oltvai, Z. N. (2002). SYSTEMS BIOLOGY: Life's Complexity Pyramid. *Science*, 298(5594), 763–764.

Ossareh-Nazari B, Bachelier F, Dargemont C. Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science*. 1997;278(5335):141-144.

Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet*. 2004;36(1):40-45.

Paine NJ, Joseph MF, Bacon SL, Julien CA, Cartier A, Ditto B, Favreau H, Lavoie KL. Association Between Depression, Lung Function, and Inflammatory Markers in Patients with Asthma and Occupational Asthma. *J. Occup. Environ. Med*. 2019 Jun;61(6):453-460.

Pajerowski AG, Nguyen C, Aghajanian H, Shapiro MJ, Shapiro VS. NKAP is a transcriptional repressor of notch signaling and is required for T cell development. *Immunity*. 2009;30(5):696-707.

Papadimitropoulos M., Anastasopoulou S., Galliopoulou E., Manousopoulou A., Biciato S., et al. Integrated high-throughput biomolecular analyses of FRA10AC1 altered expression in a human cell model. *European Journal of Human Genetics* (2019) 26: 113-819

Patel AA, Steitz JA 2003. Splicing double: Insights from the second spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 960–97

Patel KR, Cherian J, Gohil K, Atkinson D. Schizophrenia: overview and treatment options. *P T*. 2014 Sep;39(9):638-45.

Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*. 2007;368:39-57.

Rao PN, Yu H, Hodge R, Pettenati MJ, Sheetz MP. Assignment of the human kinectin gene (KTN1), encoding a kinesin-binding protein, to chromosome 14 band q22.1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1997;79(3-4):196-197.

Reddy, U. R., Pleasure, D. Cloning of a novel putative protein kinase having a leucine zipper domain from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 202: 613-620, 1994. Note: Erratum: *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 205: 1494-1495, 1994.

Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res*. 18 (21): 6409–6412.

Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487–491.

Sarah E Hunt, William McLaren, Laurent Gil, Anja Thormann, Helen Schuilenburg, et al., Ensembl variation resources, Database, Volume 2018, 2018, bay119

Sciorra, V. A., Morris, A. J. Roles for lipid phosphate phosphatases in regulation of cellular signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1582: 45-51, 2002.

Seaman, M. N. J., Harbour, M. E., Tattersall, D., Read, E., Bright, N. Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *J. Cell Sci*. 122: 2371-2382, 2009.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), 2498–2504.

Sharma, D., Cukras, A. R., Rogers, E. J., Southworth, D. R. & Green, R. Mutational analysis of S12 protein and implications for the accuracy of decoding by the ribosome. *J Mol Biol*. 374, 1065–1076

Smith SB, Aldridge PK, Callis JB. Observation of individual DNA molecules undergoing gel electrophoresis. *Science*. 1989;243:203–206.

Song F, Fan C, Wang X, Goodrich DW. The Thoc1 encoded ribonucleoprotein is a substrate for the NEDD4-1 E3 ubiquitin protein ligase. *PLoS One*. 2013;8(2):e57995.

Stanchi F, Bertocco E, Toppo S, et al. Characterization of 16 novel human genes showing high similarity to yeast sequences. *Yeast*. 2001;18(1):69-80.

Stark C, Breitkreutz BJ, Reguly T, Boucher L, Breitkreutz A, Tyers M. BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(Database issue):D535-D539.

Stelzer G, Rosen R, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analysis , *Current Protocols in Bioinformatics*(2016), 54:1.30.1 - 1.30.33.

Stuchbury, G., & Münch, G. (2010). Optimizing the generation of stable neuronal cell lines via pre-transfection restriction enzyme digestion of plasmid DNA. *Cytotechnology*, 62(3), 189–194.

Susan J. Duthie, Sabrina Narayanan, Gillian M. Brand, Lynn Pirie, George Grant, Impact of Folate Deficiency on DNA Stability, *The Journal of Nutrition*, Volume 132, Issue 8, August 2002, Pages 2444S–2449S

Tanaka M, Fukuda Y, Mashima K, Hanai R. Intracellular localization and domain organization of human TRIM41 proteins. *Mol Biol Rep.* 2005;32(2):87-93.

Tang Y, Lutz MW, Xing Y. A systems-based model of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2019 Jan;15(1):168-171.

Tataurov A. V., You Y., Owczarzy R. (2008). Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. *Biophys. Chem.* 133 (1–3): 66–70.

Thurmond, J., Goodman, J., Strelets, V., Attrill, H., Gramates, S., et al., (2019). FlyBase 2.0: the next generation. *Nucleic Acids Research.* 47 (D1): D759–D765.

Ulrich, A., Wahl, M. C. Structure and evolution of the spliceosomal peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Cwc27. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 70: 3110-3123, 2014.

Wallace L, Theou O, Rockwood K, Andrew MK. Relationship between frailty and Alzheimer's disease biomarkers: A scoping review. *Alzheimers Dement (Amst).* 2018;10:394-401.

Wang M., Yuan Z., Xie R., Ma Y., Liu X., Yu X. Structure-function analyses reveal the mechanism of the ARH3-dependent hydrolysis of ADP-ribosylation. *J. Biol. Chem.* 293:14470-14480(2018)

Will, C. L., & Lührmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(7), a003707.

Will CL, Urlaub H, Achsel T, Gentzel M, Wilm M, Lührmann R. Characterization of novel SF3b and 17S U2 snRNP proteins, including a human Prp5p homologue and an SF3b DEAD-box protein. *EMBO J.* 2002;21(18):4978-4988.

Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2017 Nov 8.

Xu, X., Song, Y., Li, Y., Chang, J., Zhang, H., & An, L. (2010). The tandem affinity purification method: An efficient system for protein complex purification and protein interaction identification. *Protein Expression and Purification*, 72(2), 149–156.

Xu, M., Xie, Y., Abouzeid, H., Gordon, C. T., Fiorentino, A., et al. Mutations in the spliceosome component CWC27 cause retinal degeneration with or without additional developmental anomalies. *Am. J. Hum. Genet.* 100: 592-604, 2017.

Yeh H, Chow M, Abrams WR, et al. Structure of the human gene encoding the associated microfibrillar protein (MFAP1) and localization to chromosome 15q15-q21. *Genomics.* 1994;23(2):443-449.

Yeh, P. C., Yeh, C. C., Chen, Y. C., & Juang, Y. L. (2012). RED, a spindle pole-associated protein, is required for kinetochore localization of MAD1, mitotic progression, and activation of the spindle assembly checkpoint. *The Journal of biological chemistry*, 287(15), 11704–11716.

Yu, H., Yan, H., Wang, L., Li, J., Tan, L., Deng, W., et al. (2018). Five novel loci associated with antipsychotic treatment response in patients with schizophrenia: a genome-wide association study. *The Lancet Psychiatry*, 5(4), 327–338.

Zhang, Q., Marioni, R. E., Robinson, M. R., Higham, J., Sproul, D., Wray, N. R., Deary, I. J., McRae, A. F., & Visscher, P. M. (2018). Genotype effects contribute to variation in longitudinal methylome patterns in older people. *Genome medicine*, 10(1), 75.

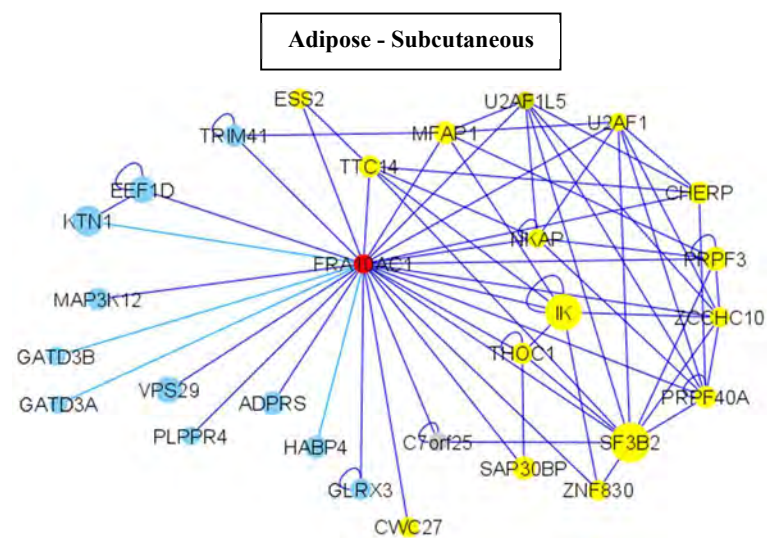
Zheng CL, Fu XD, Gribskov M. Characteristics and regulatory elements defining constitutive splicing and different modes of alternative splicing in human and mouse. *RNA*. 2005;11:1777–1787.

Γαλλιοπούλου Ελένη, (2018), Λειτουργική ανάλυση του γονιδίου *FRA10AC1* του ανθρώπου στο πλαίσιο του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του σωματίου συναρμογής. Διδακτορική Διατριβή.

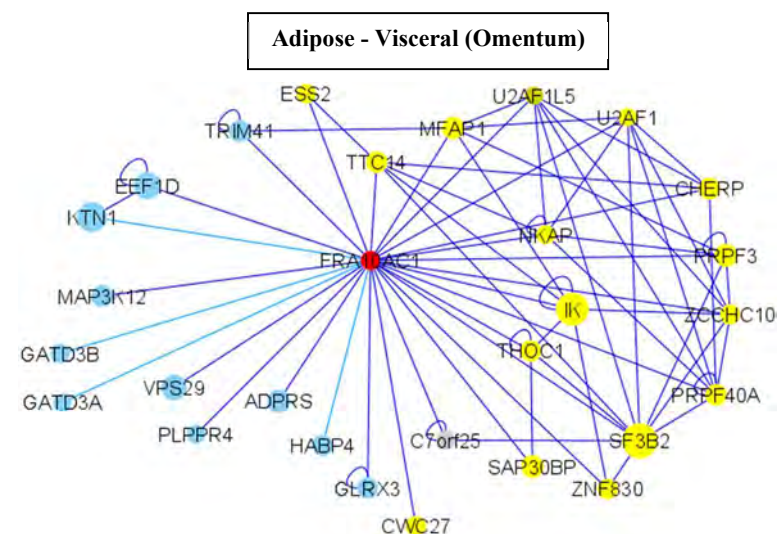
Σαραφίδου Θεολογία, (2005), Φυσικός χάρτης προς αλληλούχιση της περιοχής q23.3-q25.1 του χρωμοσώματος 10 του ανθρώπου και ανάλυση του γονιδίου *FRA10AC1*. Διδακτορική Διατριβή.

Τα δεδομένα για την ανάλυση που περιγράφεται στη παρούσα μελέτη ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων GTEx Portal στις 5/2/2020

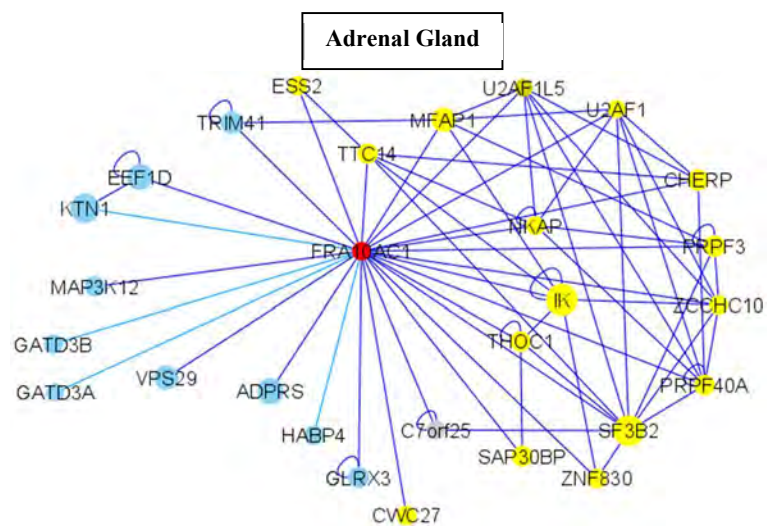
Παράρτημα 4: Τα δίκτυα άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 στους 51 ανθρώπινους ιστούς που μελετήθηκαν από τη βάση δεδομένων GTEx Portal. Το μέγεθος των κόμβων είναι ανάλογο της έκφρασης του γονιδίου της πρωτεΐνης στον ιστό. Η FRA10AC1 παρουσιάζεται με κόμβο κόκκινου χρώματος. Οι κόμβοι με κίτρινο χρώμα αναπαριστούν πρωτεΐνες που έχουν απομονωθεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής. Με κόμβο λαδί χρώματος παρουσιάζεται η U2AF1L5 η οποία, σύμφωνα με τη UniProt, συμμετέχει στο σωματίο συναρμογής, αλλά δεν έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό του (Γαλλιοπούλου, Διδακτορική διατριβή, 2018). Με κόμβο μπλε χρώματος παρουσιάζονται πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε λειτουργίες εκτός του σωματίου συναρμογής. Με κόμβο γκρι χρώματος παρουσιάζεται η C7orf25 που έχει άγνωστη λειτουργία. Οι αλληλεπιδράσεις που παρουσιάζονται με σκούρο μπλε χρώμα είναι αλληλεπιδράσεις υψηλής αξιοπιστίας με βαθμό εμπιστοσύνης 1 (PPI Quality 1), ενώ οι αλληλεπιδράσεις με γαλάζιο χρώμα είναι μέτριας αξιοπιστίας με βαθμό εμπιστοσύνης 2 (PPI Quality 2). Όλες οι αλληλεπιδράσεις συμπεριλαμβάνονται στο ικανοποιητικής αξιοπιστίας (default / cross-checked) δίκτυο της PICKLE 2.5. Τα δίκτυα παρουσιάζονται με αλφαβητική σειρά, σύμφωνα με την ονομασία που δίνεται σε κάθε ιστό από τη βάση δεδομένων GTEx Portal.



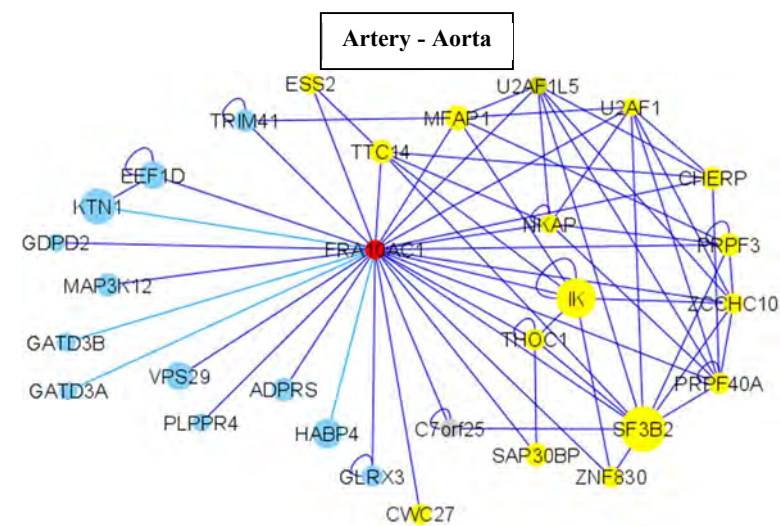
Κόμβοι: 29, Αλληλεπιδράσεις: 73



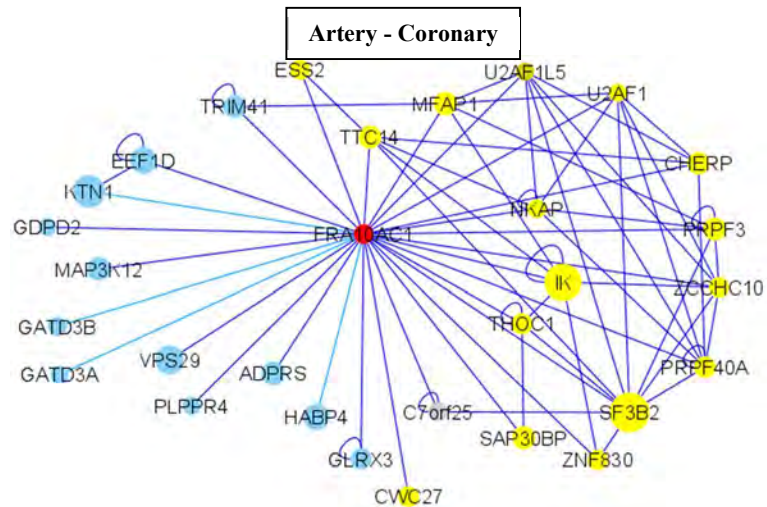
Κόμβοι: 29, Αλληλεπιδράσεις: 73



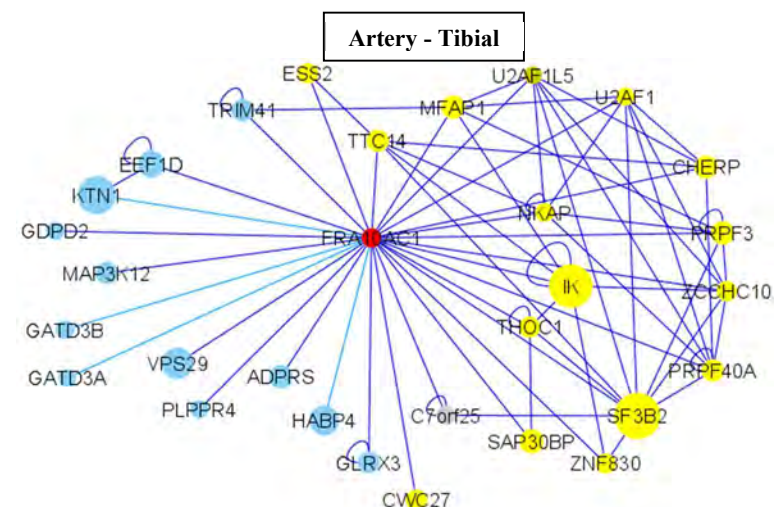
Κόμβοι: 28, Αλληλεπιδράσεις: 72



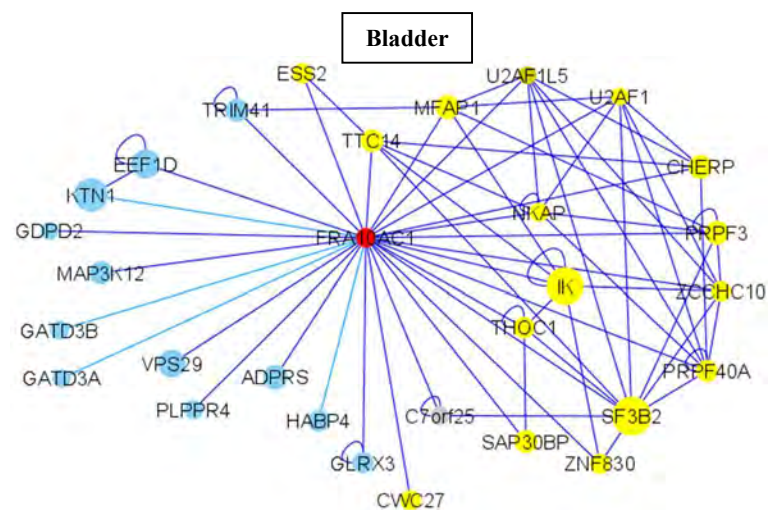
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74



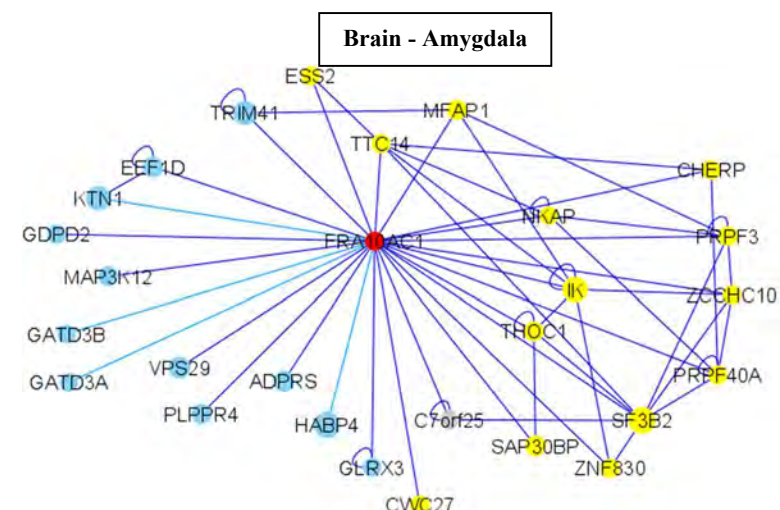
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74



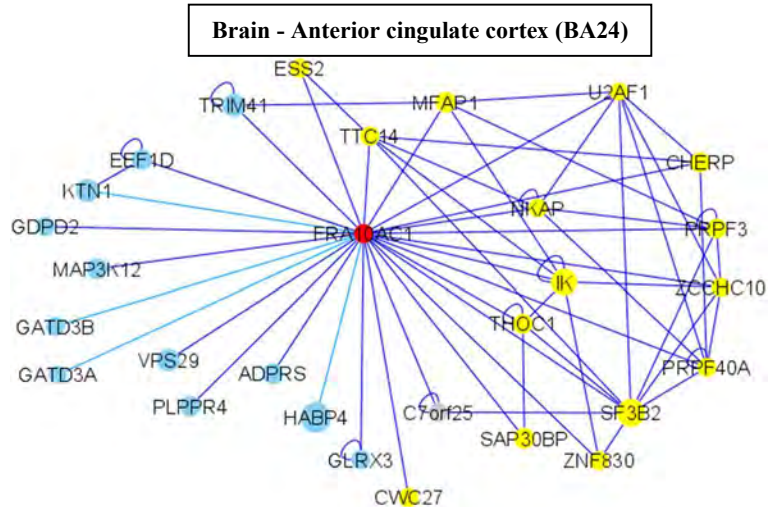
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74



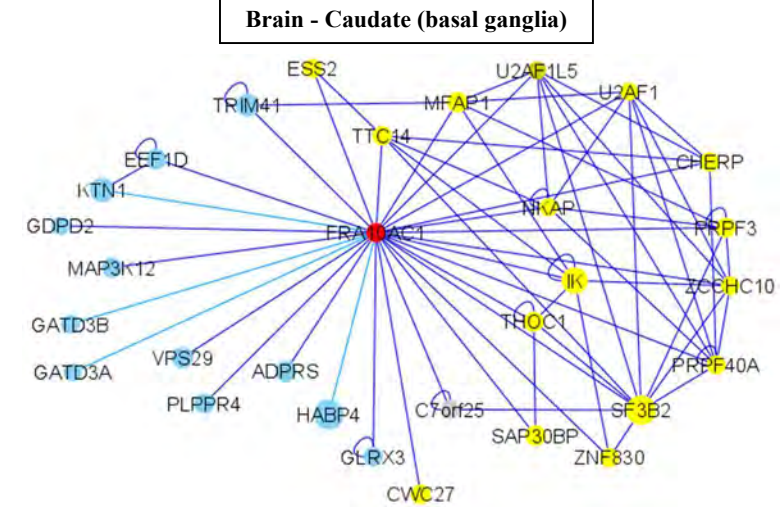
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74



Κόμβοι: 28, Αλληλεπιδράσεις: 60

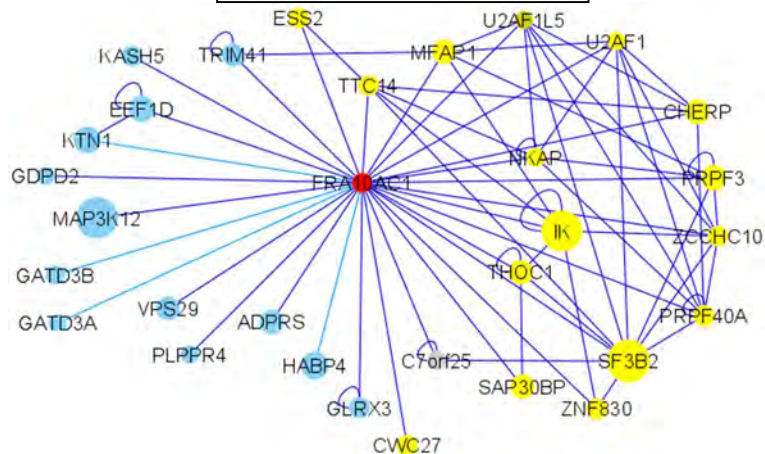


Κόμβοι: 29, Αλληλεπιδράσεις: 67



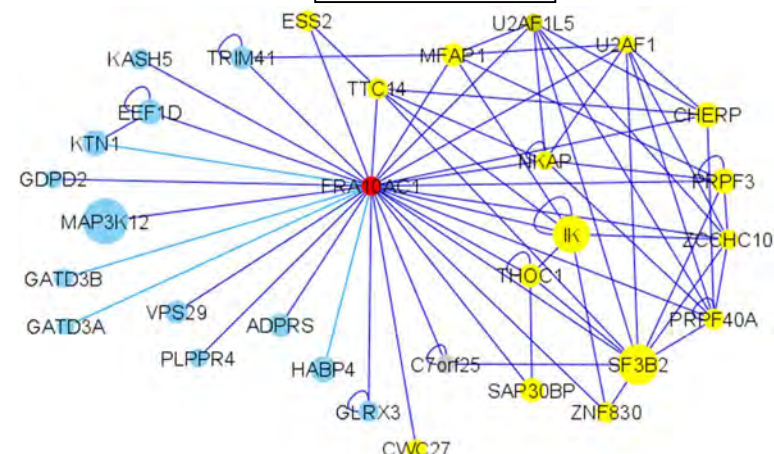
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74

Brain - Cerebellar Hemisphere



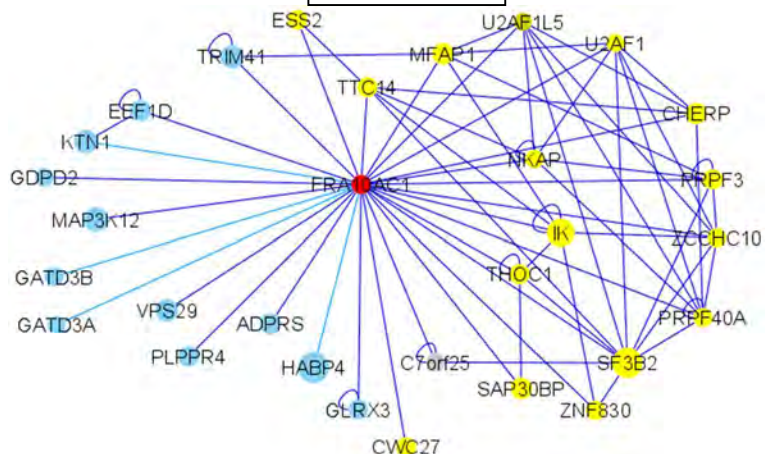
Κόμβοι: 31, Αλληλεπιδράσεις: 75

Brain - Cerebellum



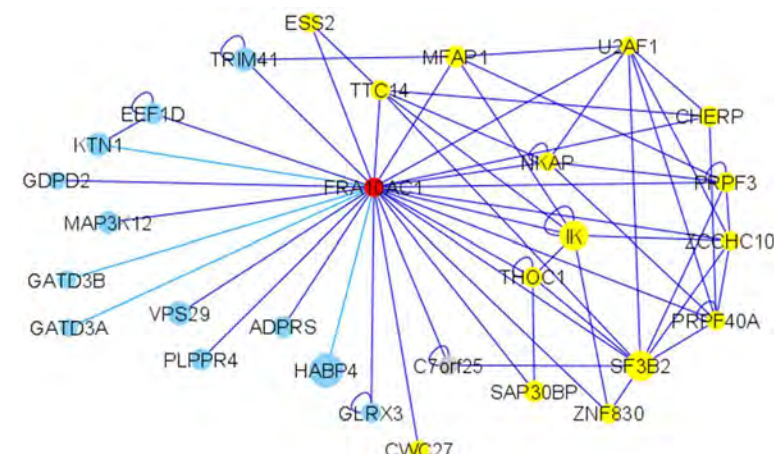
Κόμβοι: 31, Αλληλεπιδράσεις: 75

Brain - Cortex

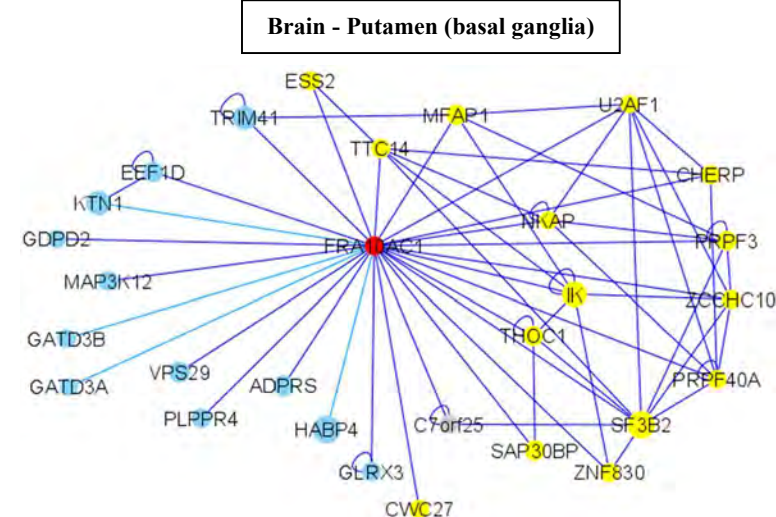
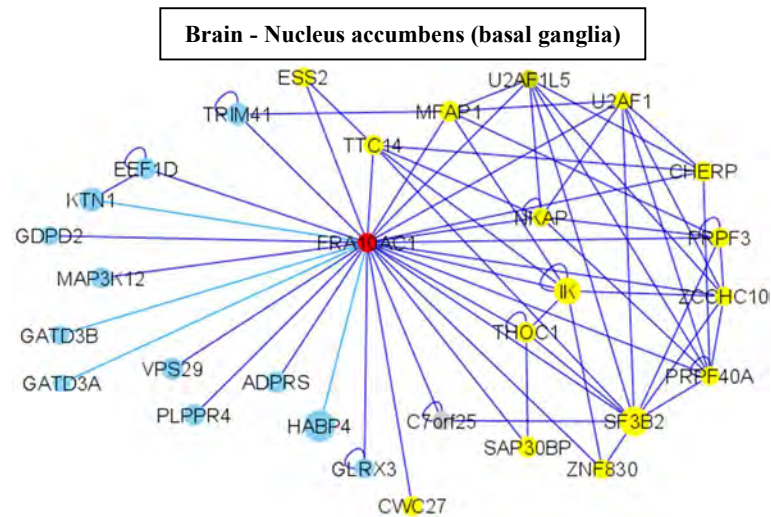
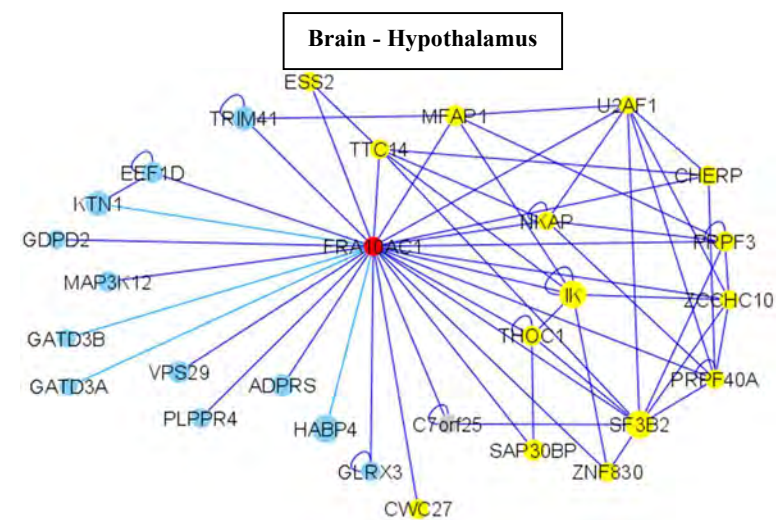
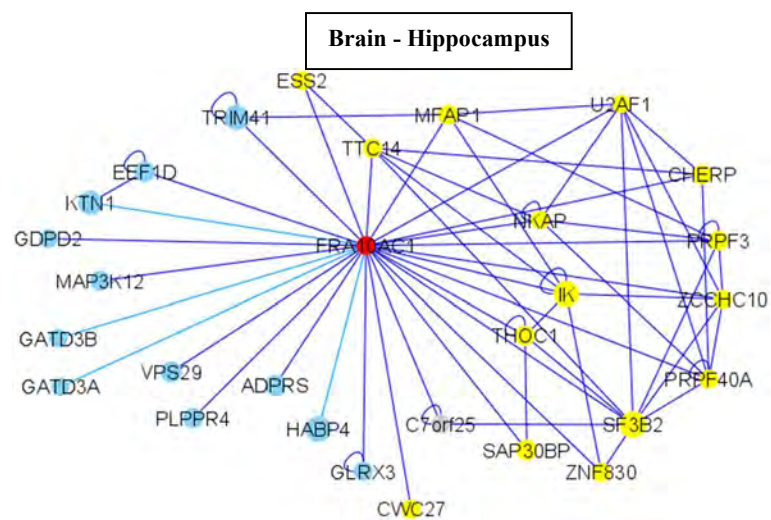


Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74

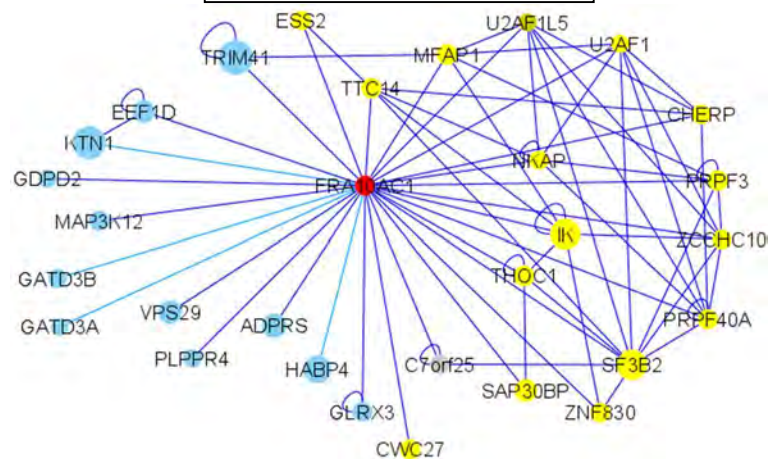
Brain - Frontal Cortex (BA9)



Κόμβοι: 29, Αλληλεπιδράσεις: 67

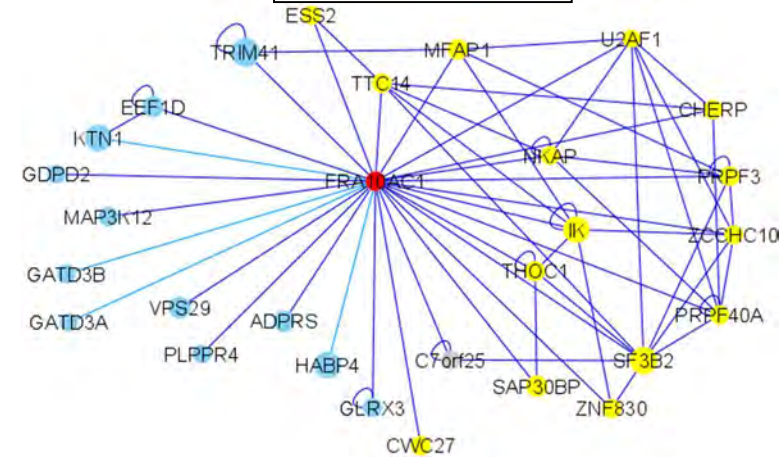


Brain - Spinal cord (cervical c-1)



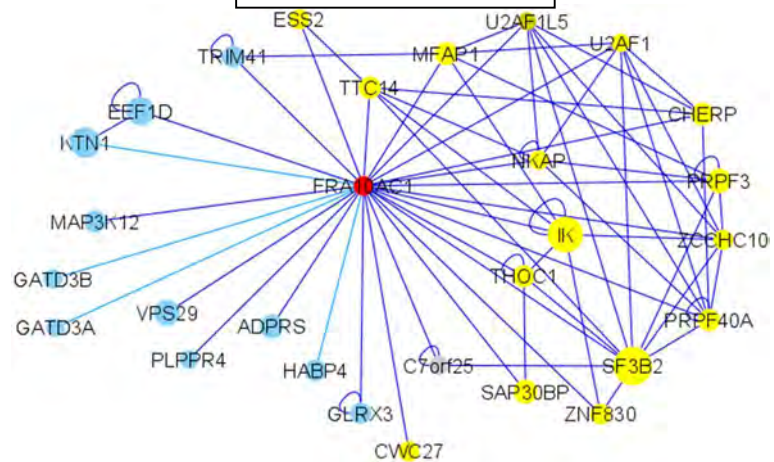
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74

Brain - Substantia nigra



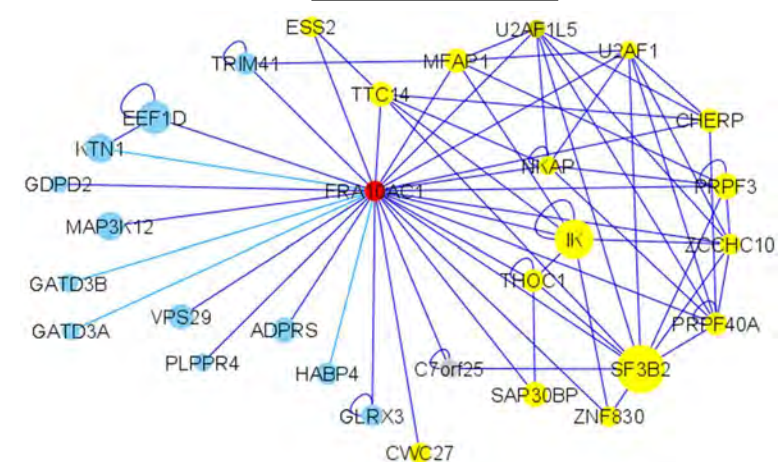
Κόμβοι: 29, Αλληλεπιδράσεις: 67

Breast - Mammary Tissue



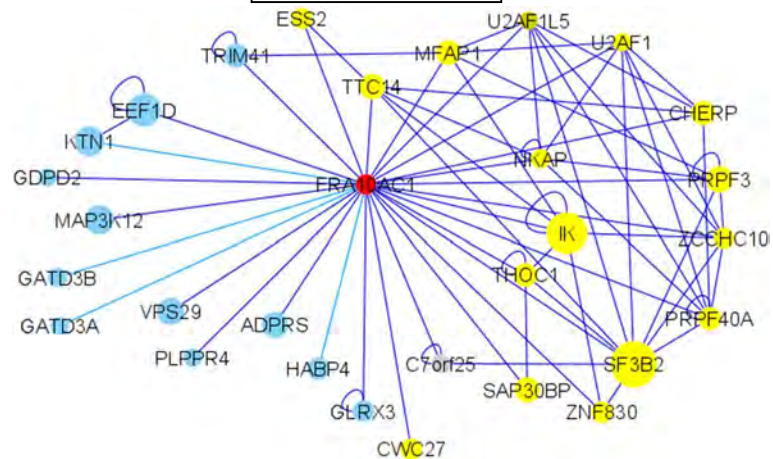
Κόμβοι: 29, Αλληλεπιδράσεις: 73

Cervix - Ectocervix



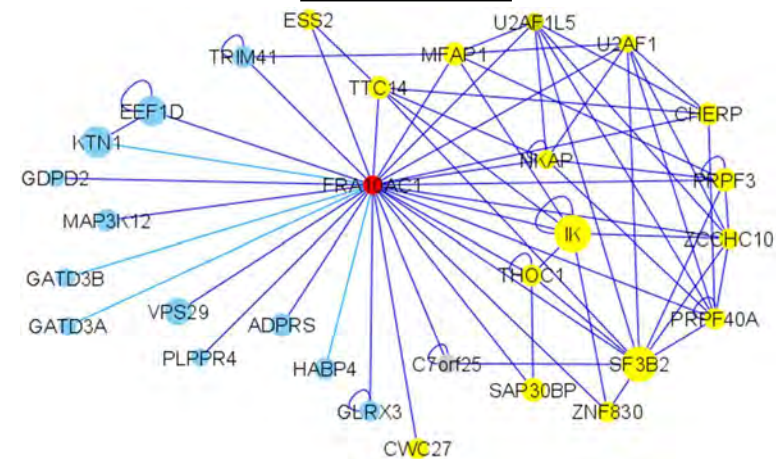
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74

Cervix - Endocervix



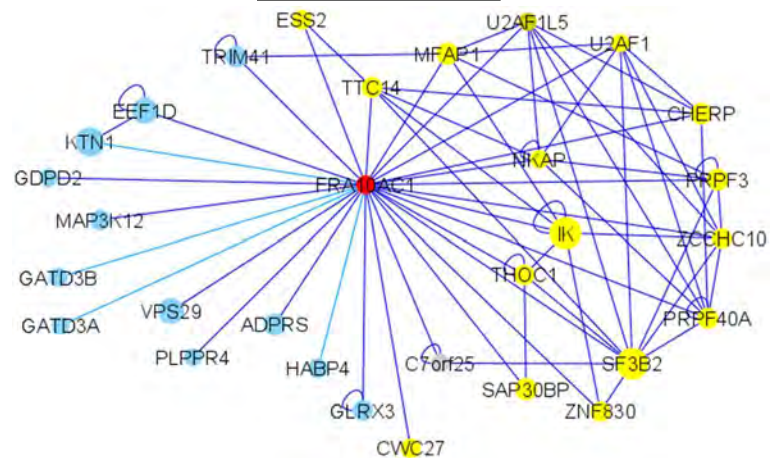
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74

Colon - Sigmoid



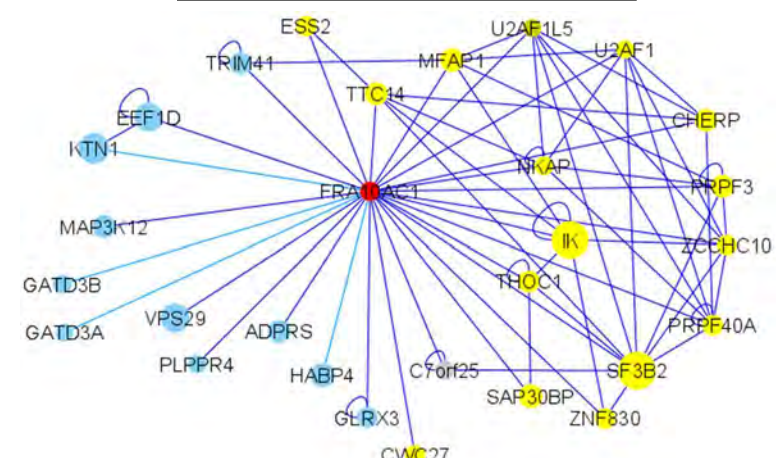
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74

Colon - Transverse



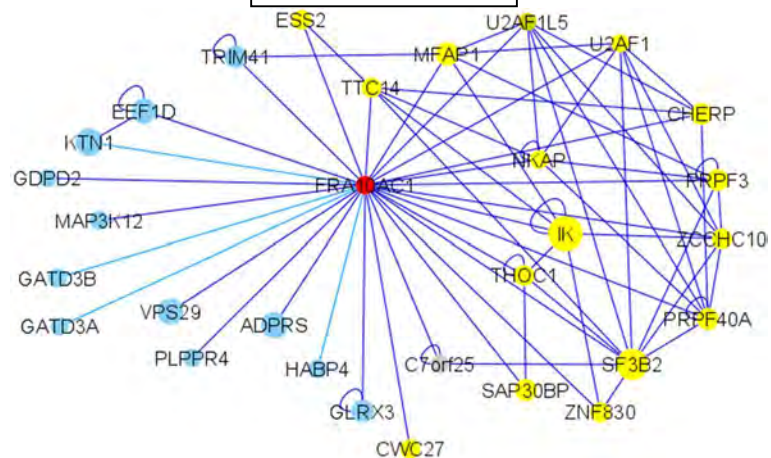
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74

Esophagus - Gastroesophageal Junction



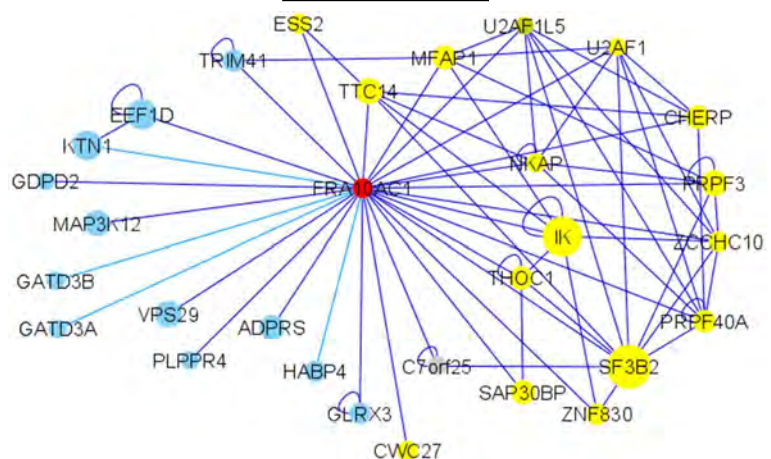
Κόμβοι: 29, Αλληλεπιδράσεις: 73

Esophagus - Mucosa



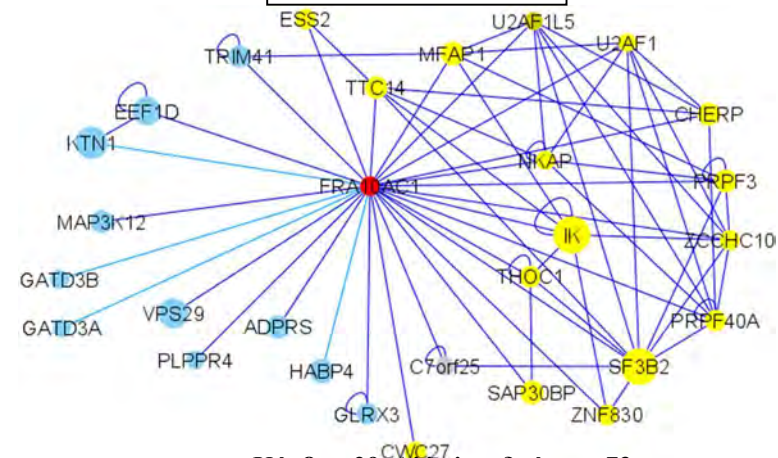
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74

Fallopian Tube



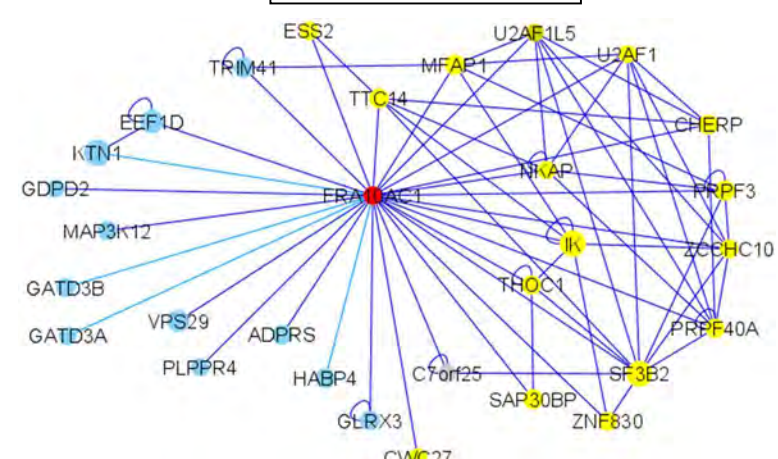
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74

Esophagus - Muscularis

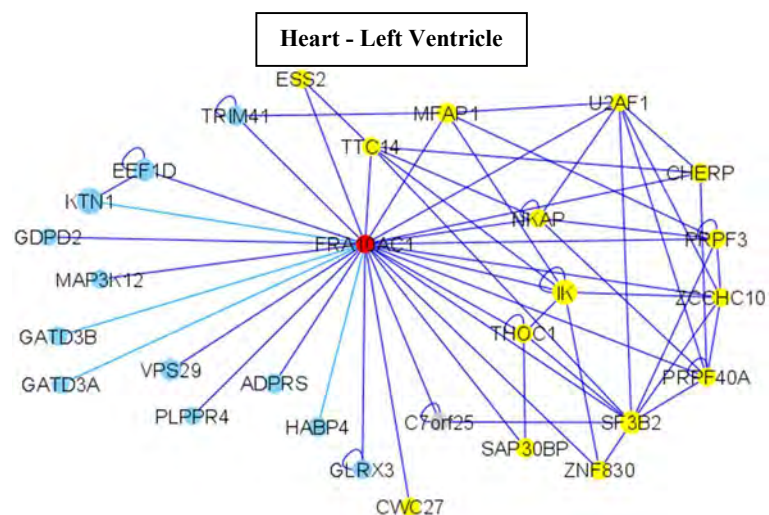


Κόμβοι: 29, Αλληλεπιδράσεις: 73

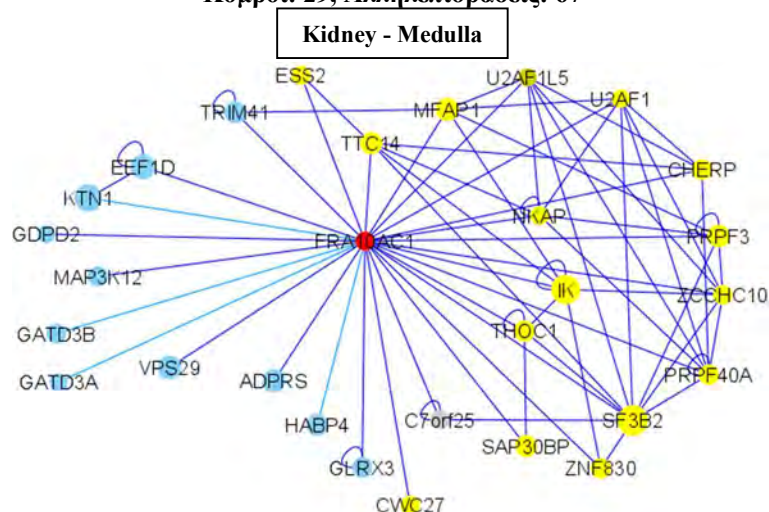
Heart - Atrial Appendage



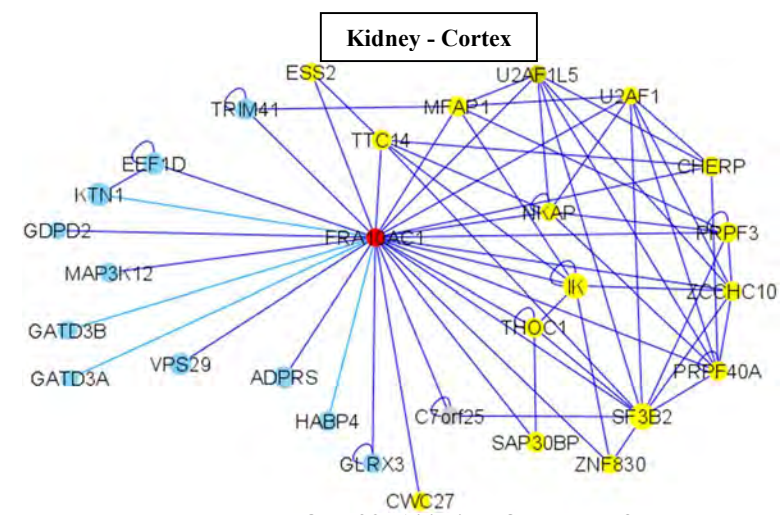
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74



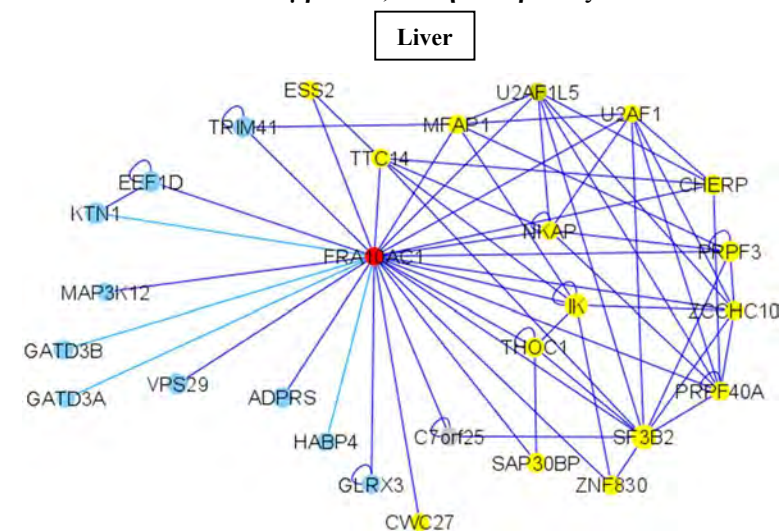
Κόμβοι: 29, Αλληλεπιδράσεις: 67



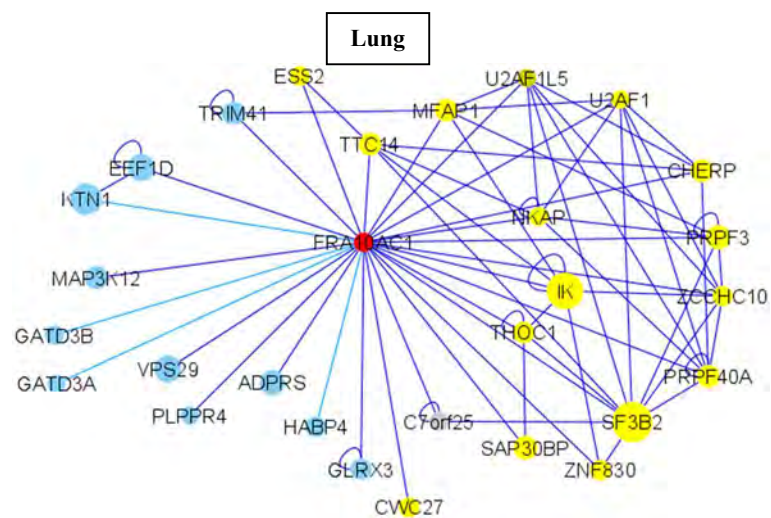
Κόμβοι: 29, Αλληλεπιδράσεις: 73



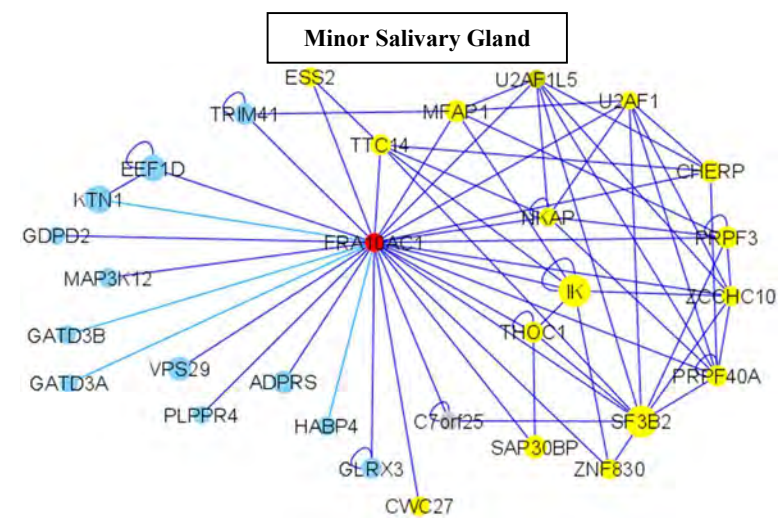
Κόμβοι: 29, Αλληλεπιδράσεις: 73



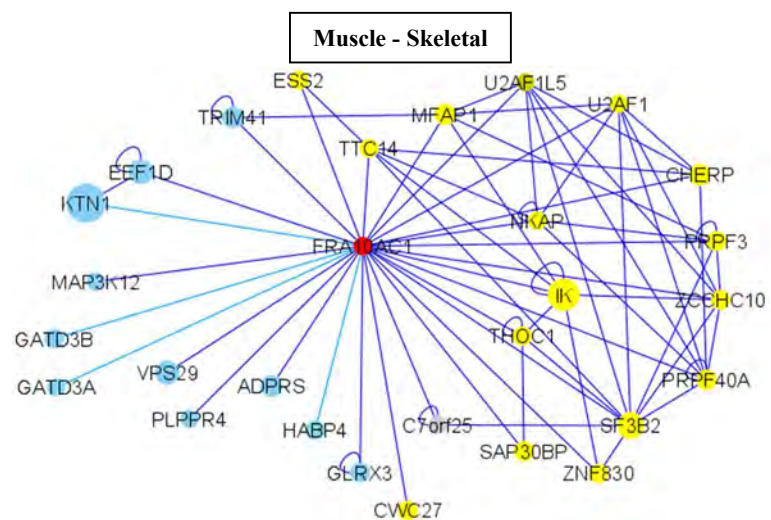
Κόμβοι: 28, Αλληλεπιδράσεις: 72



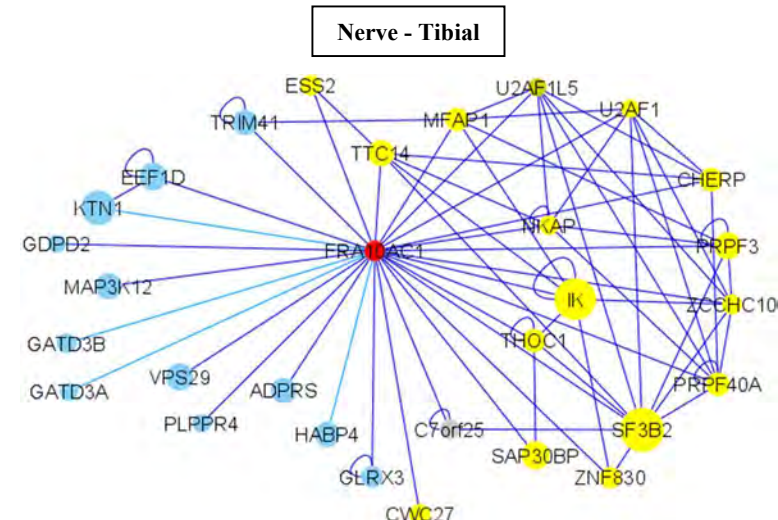
Κόμβοι: 29, Αλληλεπιδράσεις: 73



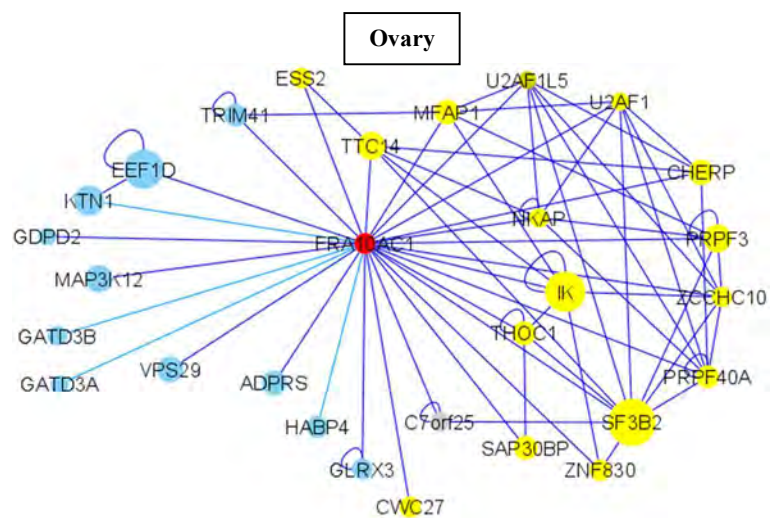
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74



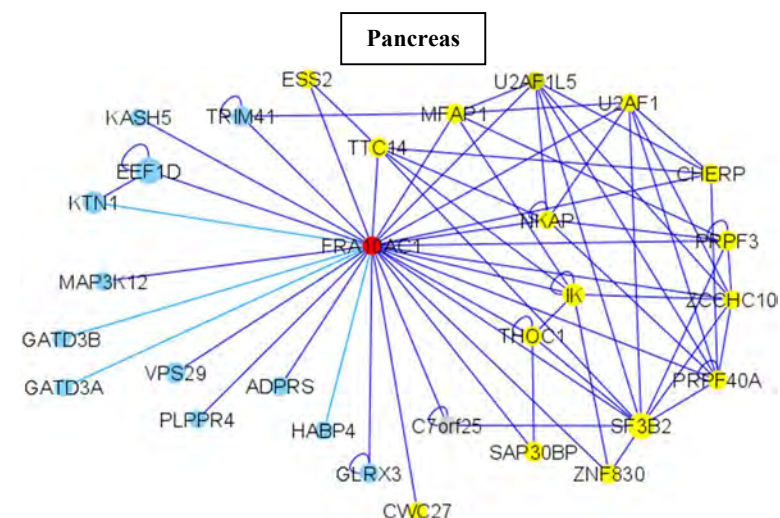
Κόμβοι: 29, Αλληλεπιδράσεις: 73



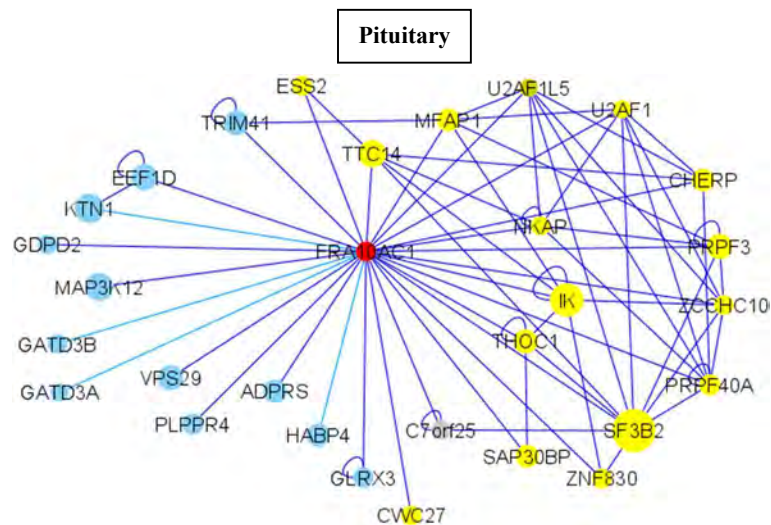
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74



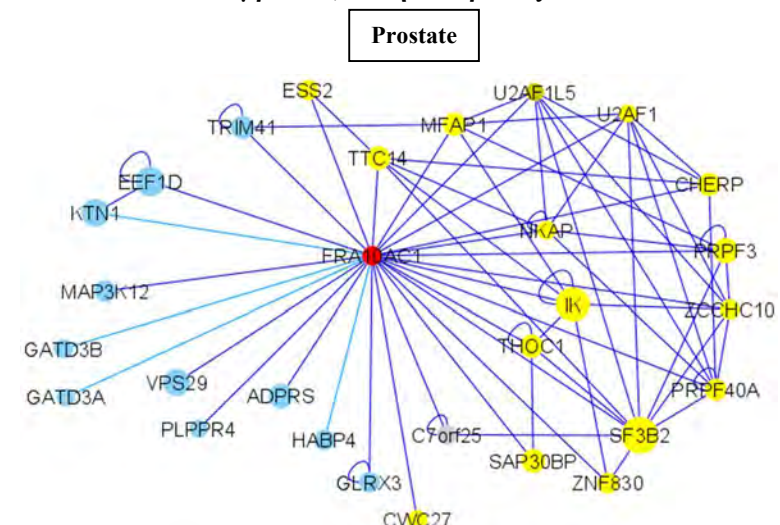
Κόμβοι: 29, Αλληλεπιδράσεις: 73



Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74

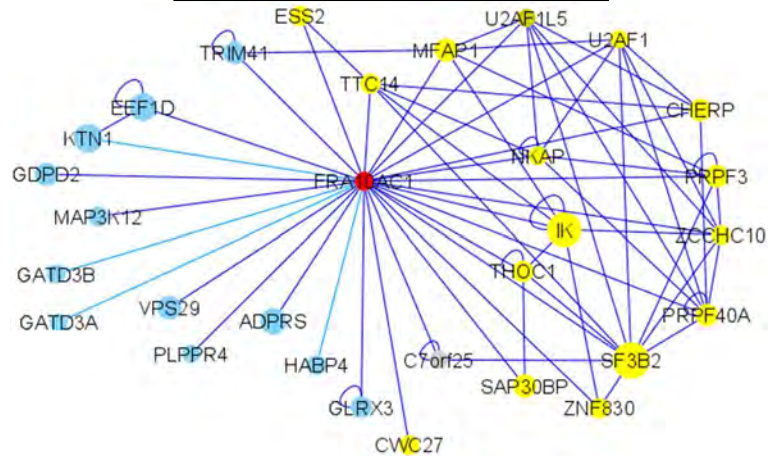


Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74



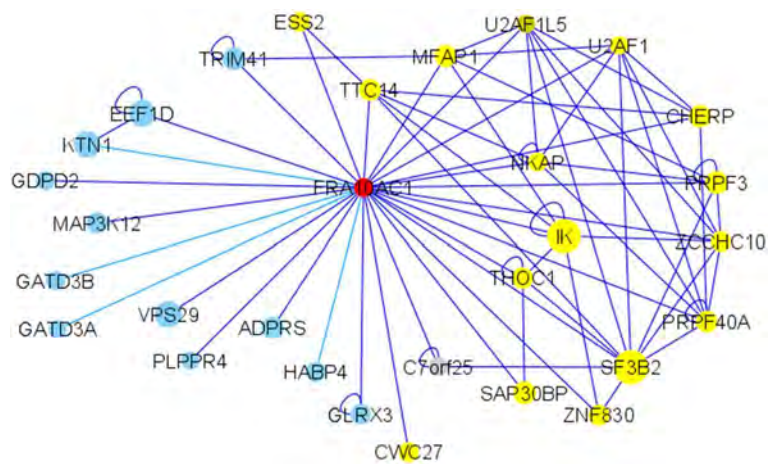
Κόμβοι: 29, Αλληλεπιδράσεις: 73

Skin - Not Sun Exposed (Suprapubic)



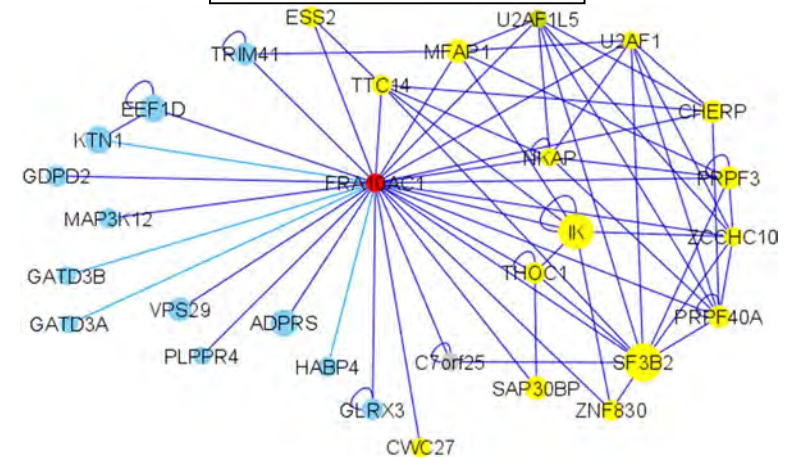
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74

Small Intestine - Terminal Ileum



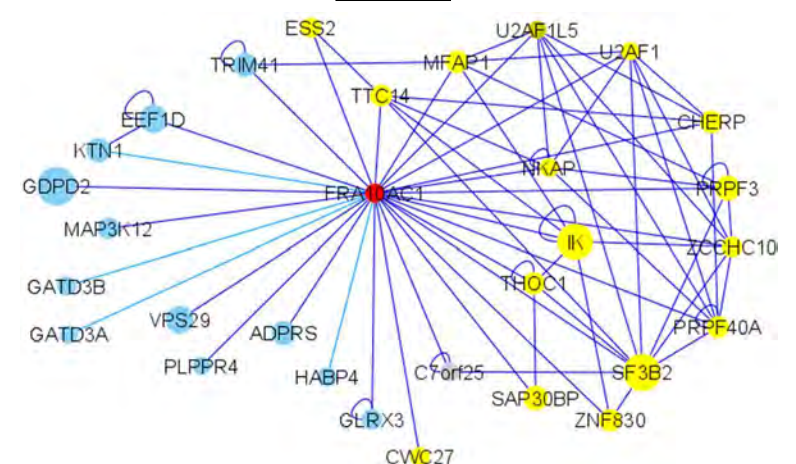
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74

Skin - Sun Exposed (Lower leg)

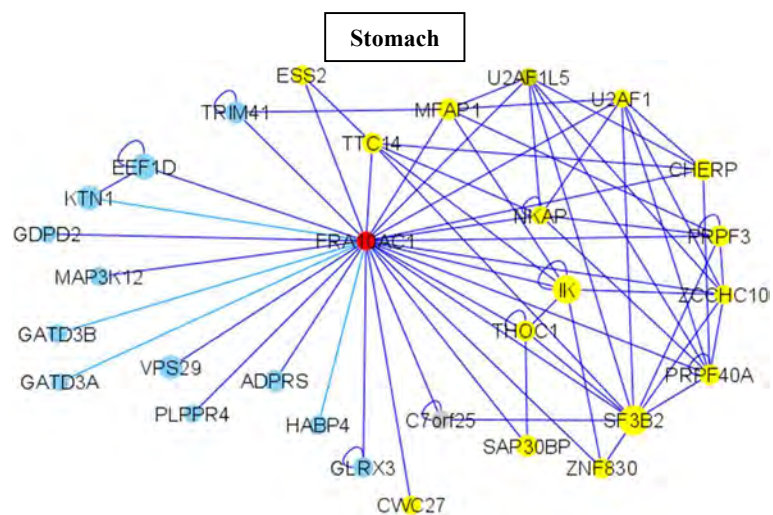


Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74

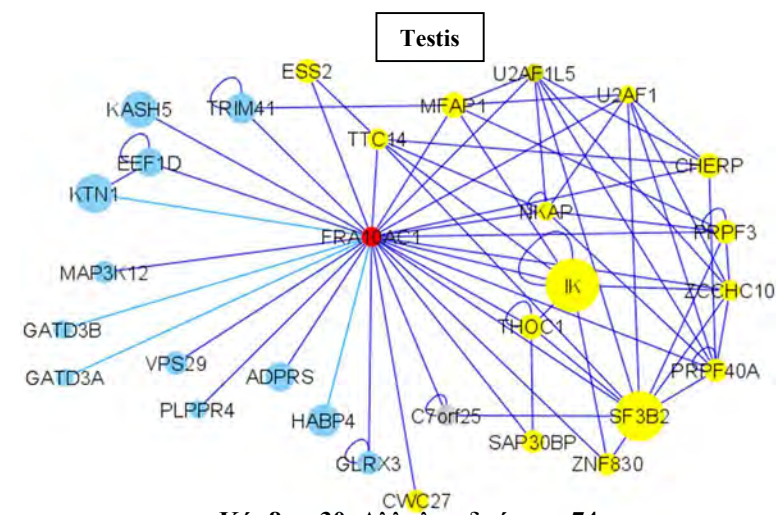
Spleen



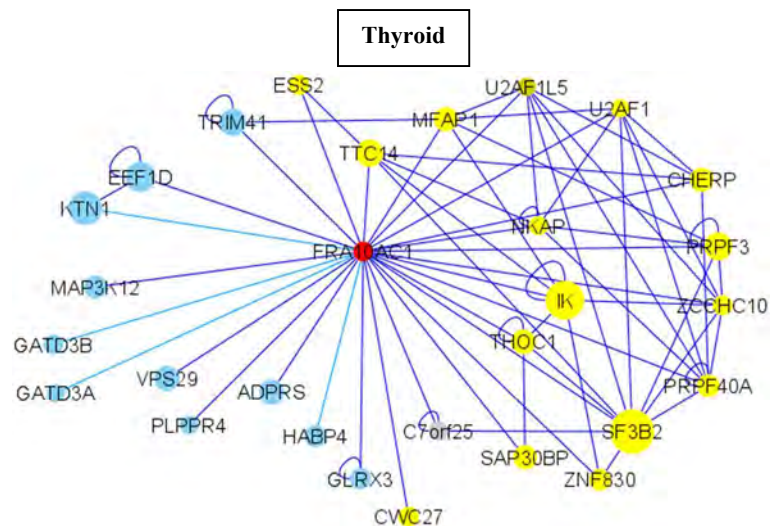
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74



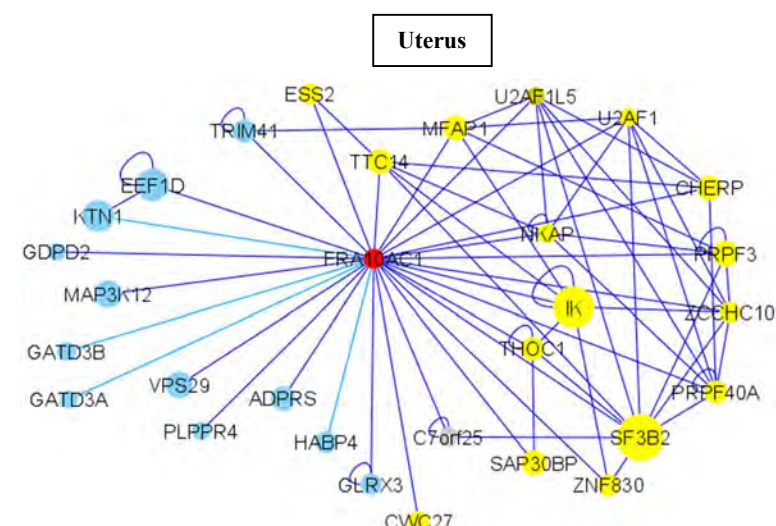
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74



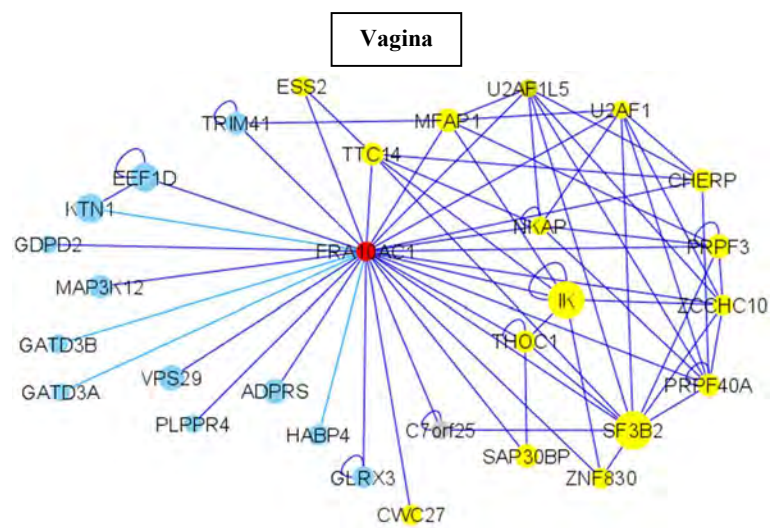
Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74



Κόμβοι: 29, Αλληλεπιδράσεις: 73



Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74



Κόμβοι: 30, Αλληλεπιδράσεις: 74