

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος  
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ  
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

Όνοματεπώνυμο: **Κατσαμόρα Έλλη**

Θέμα: «Τροποποίηση της ενεργότητας του γονιδίου  
*FRA10AC1*»

ΛΑΡΙΣΑ 2011

Θέμα: «Τροποποίηση της ενεργότητας του γονιδίου  
*FRA10A1*»

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

1. Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωϊκών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
2. Σαραφίδου Θεολογία, Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
3. Κλάπα Μαρία, Κύρια Ερευνήτρια, Διευθύντρια Εργαστηρίου Μεταβολικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας , Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ)/ Ερευνητικό Ινστιτούτο Χημικής Μηχανικής και Χημικών Διεργασιών Υψηλής Θερμοκρασίας (ΕΙΧΗΜΥΘ).

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική μεταπτυχιακή εργασία διεκπεραιώθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα μου κ. Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες αποδίδω στην κ. Σαραφίδου Θεολογία, Λέκτορα Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, για την πολύτιμη καθοδήγηση και συνεχή υποστήριξή της κατά την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας, για τις γνώσεις που μου μετέδωσε και για τη συμμετοχή της στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Την ευχαριστώ ειλικρινά γιατί στάθηκε δίπλα μου σε όλη αυτή την πορεία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Κλάπα Μαρία, διευθύντρια του Εργαστηρίου Μεταβολικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας του ΙΤΕ/ΕΙΧΗΜΥΘ, στο οποίο πραγματοποιήθηκαν οι μεταβολικές μετρήσεις των κυττάρων, για την καλή μας συνεργασία και τη συμμετοχή της στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω την κ. Λιαδάκη Καλλιόπη, Λέκτορα Βιοχημικής Φαρμακολογίας, για τη συμβολή της στην ολοκλήρωση της εργασίας.

Επίσης, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στον κ. Σταμάτη Κων/νο, καθώς και στους υποψήφιους διδάκτορες και φοιτητές του εργαστηρίου για το ευχάριστο και φιλικό περιβάλλον και τη βοήθεια που μου προσέφεραν κάθε φορά που τη χρειάστηκα. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συνάδελφο και φίλη Γαλλιοπούλου Ελένη για την άριστη συνεργασία μας και τη βοήθεια που μου παρείχε.

Κλείνοντας, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και τους φίλους μου για την πολύπλευρη στήριξή τους κατά την διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής, αλλά και σε όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

<b>ΚΕΦ. 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	1
1.1. Εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις	2
1.2. Η εύθραυστη χρωμοσωματική θέση <i>FRA10A</i> και το γονίδιο <i>FRA10AC1</i>	3
1.3. Η πρωτεΐνη <i>FRA10AC1</i>	4
1.4. Λειτουργική ανάλυση του γονιδίου <i>FRA10C1</i>	6
1.5. Λειτουργική ανάλυση γονιδίων σε κυτταρικό επίπεδο με «ομικές» τεχνολογίες	7
1.6. Μεταβολομική (Metabolomics)	9
1.7. Μεθοδολογία και τεχνικές της μεταβολομικής	12
▪ Τα στάδια σε μια μεταβολομική μελέτη	12
▪ Τεχνικές μεταβολομικής ανάλυσης	13
1.8. Εφαρμογές της Μεταβολομικής	13
1.9. Μεταβολομική ανάλυση σε κυτταροκαλλιέργειες	15
1.10. Σκοπός της εργασίας	17

## **ΚΕΦ. 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ** 18

### **ΥΛΙΚΑ** 19

2.1. Καλλιέργεια βακτηρίων	19
▪ Βακτηριακά στελέχη	19
▪ Θρεπτικά	19
▪ Αντιβιοτικά	19
2.2. Καλλιέργεια κυττάρων <i>HeLa</i>	20
▪ Κυτταρική σειρά <i>HeLa</i>	20
▪ Διαλύματα για την ανάπτυξη και διατήρηση των κυττάρων	20
2.3. Πλασμιδιακές κατασκευές	21
2.4. Αντισώματα	22

### **ΜΕΘΟΔΟΙ** 23

2.5. Καθαρισμός συγγένειας πολυκλωνικού αντισώματος	23
2.5.1. Παραγωγή και απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βακτήρια	23

▪ Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων	24
▪ Παραγωγή πρωτεΐνης σε βακτήρια	24
▪ Απομόνωση πρωτεΐνης με στήλη χρωματογραφίας με υπόστρωμα αγαρόζη-Ni-NTA	25
2.5.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)	26
▪ Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης	27
2.5.3. Υγρή ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη	29
2.5.4. Πρόσδεση και έκλουση αντισώματος	30
2.6. Ποσοτικοποίηση αντισώματος	30
2.7. Ανάλυση Western	31
▪ Ανίχνευση σήματος με χημειοφωταύγεια	32
2.8. Καλλιέργεια κυττάρων <i>HeLa</i>	33
2.9. Κρυοδιατήρηση κυττάρων <i>HeLa</i> και επανακαλλιέργεια	34
2.10. Μέτρηση αριθμού κυττάρων	35
2.11. Συλλογή κυττάρων <i>HeLa</i> για μέτρηση μεταβολιτών	37
2.12. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων <i>HeLa</i> με συγκατακρήμνιση του DNA με $Ca_3(PO_4)_2$	37
2.13. Μονιμοποίηση κυττάρων σε καλυπτρίδα και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού	39
2.14. Μεταβολομική ανάλυση με χρωματογραφία αερίων- φασματομετρία μάζας	39
<b>ΚΕΦ.3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	41
3. 1. Καθαρισμός αντισώματος α-FRA10AC1	42
3.1.1. Παραγωγή και απομόνωση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε βακτήρια	42
3.1.2. Πρόσδεση, έκλουση και ποσοτικοποίηση αντισώματος	43
3. 2. Έλεγχος ποιότητας αντισώματος με ανάλυση Western	44
3.3. Βελτιστοποίηση μεθόδου συλλογής κυττάρων <i>HeLa</i> για ανίχνευση μεταβολιτών με χρωματογραφία αερίων-φασματομετρία μάζας	46
3.4. Υπερέκφραση του γονιδίου <i>FRA10AC1</i> σε κύτταρα <i>HeLa</i>	49
<b>ΚΕΦ. 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	52
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	53

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γονίδιο *FRA10AC1* χαρτογραφείται στην εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A* στη χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3 του ανθρώπου. Κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη 315 αμινοξέων άγνωστης λειτουργίας, για την οποία υπάρχουν ενδείξεις ότι συμμετέχει στη διαδικασία της συναρμογής ή/και πιθανόν σε άλλες στενά συσχετιζόμενες λειτουργίες. Στο πλαίσιο της λειτουργικής ανάλυσης, και ειδικότερα της μελέτης του βιολογικού ρόλου του γονιδίου *FRA10AC1* σε κυτταρικό επίπεδο, η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία αποσκοπεί στον προσδιορισμό του μεταβολικού προτύπου των κυττάρων *HeLa* ώστε να πραγματοποιηθεί μελλοντικά η μεταβολομική ανάλυση του αποτελέσματος της υπερέκφρασης και καταστολής του γονιδίου και να προσδιοριστούν τα αντίστοιχα μεταβολικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει η πρωτεΐνη. Στο πρώτο μέρος της εργασίας, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του αντισώματος α-FRA10AC1 από πολυκλωνικό ορό κουνελιού, ώστε να χρησιμοποιηθεί στον μελλοντικό έλεγχο της τροποποίησης του γονιδίου με ανάλυση Western. Η ποιότητα του αντισώματος ελέγχθηκε με ανάλυση Western, κατά την οποία το αντίσωμα αναγνώρισε ειδικά την ενδογενή *FRA10AC1* σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων *HeLa*. Στο δεύτερο μέρος της εργασίας, βελτιστοποιήθηκε η μέθοδος χειρισμού και συλλογής των κυττάρων *HeLa* και ο προσδιορισμός του μεταβολικού τους προτύπου με υψηλή διακριτική ικανότητα, μέσω χρωματογραφίας αερίων-φασματομετρίας μάζας (GC-MS). Ακολούθησε η παροδική διαμόλυνση κυττάρων *HeLa* με πλασμιδιακή κατασκευή που περιλαμβάνει το πλήρους μήκους cDNA του γονιδίου *FRA10AC1* που είχε ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε επίπεδα 2,7 φορές αυξημένα σε σχέση με την ενδογενή. Τα αντίστοιχα δείγματα συλλέχθηκαν και θα χρησιμοποιηθούν για τον συγκριτικό προσδιορισμό του μεταβολικού προτύπου με GC-MS.

## ABSTRACT

The *FRA10AC1* gene is mapped at human chromosomal fragile site *FRA10A* at 10q23.3. It encodes a nuclear protein (315 amino acids) which is possibly implicated in splicing or/and other related procedures. In the context of the *FRA10AC1* gene functional analysis at the cell level, this work aims at the determination of *HeLa* cells metabolic profile in order to be compared with the respective profiles of cells which over-express or have silenced *FRA10AC1* gene and in the long-term to identify perturbed metabolic networks. In the first part of this work, the  $\alpha$ -*FRA10AC1* polyclonal antibody was purified from rabbit serum, in order to be used for quantification of gene over-expression and silencing in *HeLa* cells. *FRA10AC1* purified antibody specifically recognizes the endogenous protein in *HeLa* cells, as has been shown with Western analysis. The second part of this work includes the optimization of *HeLa* cells manipulation and collection and the determination of their metabolic profile through gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Finally, *HeLa* cells were transiently transfected with a plasmid construct that codes for the full length protein. According to Western analysis in *HeLa* cell extracts, the recombinant *FRA10AC1* protein was over-expressed 2,7 times in comparison to the endogenous. The samples were collected and their metabolic profile will be comparatively analyzed with GC-MS.



## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1.1. Εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις

Οι εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις είναι σημεία στα χρωμοσώματα τα οποία εμφανίζουν μη τυχαία την τάση να θραύονται, όταν τα χρωμοσώματα εκτίθενται σε συγκεκριμένους χημικούς παράγοντες ή σε ειδικές συνθήκες καλλιέργειας (Sutherland GR. 1988). Μετά από χρώση μεταφασικών χρωμοσωμάτων, τα οποία έχουν καλλιεργηθεί στις ειδικές συνθήκες που επάγουν την έκφραση των εύθραυστων χρωμοσωματικών θέσεων, αυτά τα σημεία εμφανίζονται ως μη χρωματισμένα «κενά».

Οι εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις υπάρχουν στο γονιδίωμα διαφόρων ειδών και αποτελούν δομικά χαρακτηριστικά των χρωμοσωμάτων των θηλαστικών. Έχει δειχθεί ότι έχουν συντηρηθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των πρωτευόντων (Ruiz-Herrera A. *et al.* 2004).

Στον άνθρωπο, οι εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις διακρίνονται στις σπάνιες, οι οποίες εμφανίζονται σε ποσοστό μικρότερο από 5% του πληθυσμού και στις συνήθεις, οι οποίες θεωρητικά βρίσκονται σε όλα τα άτομα (Zlotorynski E. *et al.* 2003). Στην πρώτη κατηγορία, ανήκουν οι εύθραυστες θέσεις που επάγονται από την απουσία φυλλικού οξέος στο θρεπτικό καλλιέργειας (π.χ. *FRA10A*, *FRAXA*) και οι θέσεις που για να επαχθούν απαιτούν την παρουσία αναστολέων της αντιγραφής του DNA οι οποίοι προσδένονται στη μικρή έλικα του DNA, όπως η δισταμυκίνη A και η Brd-U (Sutherland GR. *et al.* 1984). Αντίθετα, οι περισσότερες συνήθεις εύθραυστες θέσεις επάγονται από έναν άλλο αναστολέα της αντιγραφής, την αφιδικολίνη (Glover TW. *et al.* 1984).

Η μοριακή βάση των σπάνιων εύθραυστων χρωμοσωματικών θέσεων, οι οποίες επάγονται από την απουσία φυλλικού οξέος, είναι η επέκταση τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων του τύπου CCG/CGG, η οποία κατά κανόνα ακολουθείται από υπερμεθυλίωση του DNA και κατ' επέκταση μεταγραφική καταστολή. Στις μη ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ θέσεις, η μοριακή βάση έχει δειχθεί ότι είναι η επέκταση επαναλήψεων σε μινι-δορυφορικές περιοχές πλούσιες σε AT (Sutherland GR. 2003, Lukusa T. 2008). Η επέκταση των ανάστροφων επαναλήψεων AT/TA προκαλεί τη δημιουργία δευτεροταγών δομών φουρκέτας, οι οποίες εμποδίζουν την αντιγραφή του DNA (Hewett D.R. *et al.* 1998, Handt O. *et al.* 2000).

Οι συνήθεις εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις που έχουν χαρακτηριστεί σε μοριακό επίπεδο έχει βρεθεί ότι είναι περιοχές σχετικά πλούσιες σε AT, χωρίς όμως να διαθέτουν εκτεταμένα μοτίβα επανάληψης όπως οι σπάνιες θέσεις. Η ανάλυση των δομικών χαρακτηριστικών του DNA σε ορισμένες από τις συνήθεις εύθραυστες

χρωμοσωματικές θέσεις (Ried K. *et al.* 2000, Shiraishi T. *et al.* 2001, Morelli C. *et al.* 2002, Zlotorynski E. *et al.* 2003) έχει δείξει ότι οι περιοχές αυτές οι οποίες περιέχουν νησίδα του δινουκλεοτιδίου AT χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ευκαμψία του DNA σε σχέση με τις γειτονικές μη εύθραυστες περιοχές. Τα νησίδα αυτά έχουν την δυνατότητα να σχηματίζουν δευτεροταγείς μη B-δομές DNA, εμποδίζοντας την αντιγραφή του DNA, όπως συμβαίνει και στις σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις με μινι-δορυφορικές περιοχές πλούσιες σε AT (Krajewski W.A. *et al.* 1997).

## **1.2. Η εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A* και το γονίδιο *FRA10AC1***

Η εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A* ανήκει στις σπάνιες εύθραυστες θέσεις του ανθρώπου που επάγονται απουσία φυλλικού οξέος. Κυτταρογενετικά, είχε χαρτογραφηθεί στη χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3. (Sarafidou *et al.* 2004). Εκτιμάται ότι αποτελεί την πιο συνήθη (1/500 άτομα) από τις σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις στα αυτοσωματικά χρωμοσώματα του ανθρώπου (Petit P. 1986). Έχει βρεθεί μόνο σε ετεροζυγωτία, όπως και οι υπόλοιπες σπάνιες εύθραυστες αυτοσωματικές θέσεις οι οποίες επάγονται απουσία φυλλικού οξέος. Το γεγονός αυτό μπορεί πιθανόν να οφείλεται στο ότι η έκφραση της εύθραυστης θέσης σε ομοζυγωτία είναι μη συμβατή με τη ζωή και ενδεχομένως οδηγεί σε αποβολές εμβρύων. Για τη διατύπωση πιο σαφών υποθέσεων σχετικά με τις επιπτώσεις της έκφρασης τέτοιων εύθραυστων θέσεων σε ομοζυγωτία απαιτείται ο ακριβής χαρακτηρισμός των γονιδίων που ενδεχομένως βρίσκονται στις θέσεις αυτές (Sutherland GR & Baker E, 2000). Όσον αφορά στην κλινική σημασία της έκφρασης της *FRA10A*, μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν αποδείξεις για σαφή συσχέτιση με κάποιον παθολογικό φαινότυπο. Ωστόσο, έχει προταθεί ότι η έκφρασή της πιθανώς σχετίζεται με νοητική και αναπτυξιακή υστέρηση (Mavrou *et al.* 1991).

Το 2004 προσδιορίστηκε με ανάλυση *FISH* ότι στην *FRA10A* χαρτογραφείται το γονίδιο *FRA10AC1* και με μοριακές μεθόδους ότι η έκφραση αυτής της θέσης οφείλεται στην επέκταση (> 200 φορές) επαναλήψεων CGG, που εντοπίζονται στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου *FRA10AC1* (Sarafidou *et al.* 2004). Στο γενικό πληθυσμό, αυτές οι τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις εμφανίζουν πολυμορφισμό ως προς τον αριθμό τους, ο οποίος όμως περιορίζεται έως λίγα αντίγραφα (< 14).

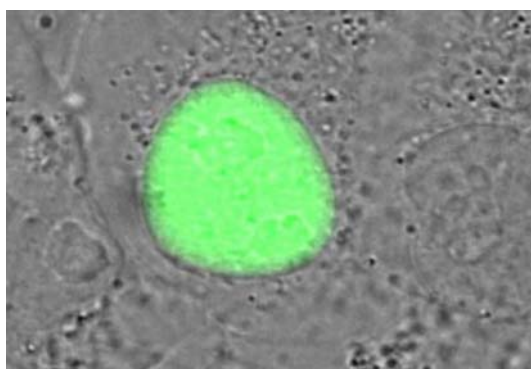
Το γονίδιο *FRA10AC1* εκτείνεται σε μια περιοχή 33 kb και μεταγράφεται με κατεύθυνση από το τελομερές προς το κεντρομερές. Αποτελείται από 19 εξόνια, 4 από τα οποία (13, 14, 15, 16) υπόκεινται σε εναλλακτική συναρμογή. Οι τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις (CGG)<sub>n</sub>, εντοπίζονται στο εξόνιο 1. Το cDNA του

*FRA10AC1* αποτελείται από 1344 bp. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 315 αμινοξέων με εκτιμώμενο μοριακό βάρος 37,5 kDa.

Το γονίδιο *FRA10AC1* εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Αναλυτικότερα, με ανάλυση Northern και RT-PCR έχουν δειχθεί υψηλά επίπεδα έκφρασης σε εγκέφαλο, καρδιά, νεφρούς, ήπαρ και σκελετικούς μύες και χαμηλότερα επίπεδα σε θύμο αδένες, σπλήνα, πνεύμονες, πλακούντα, παχύ και λεπτό έντερο. Το κύριο μετάγραφο, που εμφανίζει τη μεγαλύτερη αφθονία στους ιστούς που μελετήθηκαν, προκύπτει από τη συναρμογή μεταξύ των εξονίων 12 και 18. Ένα εναλλακτικό μετάγραφο, που περιλαμβάνει επιπλέον και το εξόνιο 16, εμφανίζεται σε χαμηλότερα επίπεδα στους περισσότερους ιστούς. Η προβλεπόμενη πρωτεΐνη, που προκύπτει από το μετάγραφο αυτό, περιλαμβάνει 276 αμινοξέα. Επιπλέον, στους όρχεις εντοπίστηκαν τρία επιπλέον μετάγραφα τα οποία είναι αποτέλεσμα εναλλακτικής συναρμογής ανάμεσα στα εξόνια 13, 14, 15, αντίστοιχα, και 16 (Sarafidou *et al.* 2004).

### 1.3. Η πρωτεΐνη *FRA10AC1*

Η πρωτεΐνη *FRA10AC1* αποτελείται από 315 αμινοξέα, έχει θεωρητικό μοριακό βάρος 37.548 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο pI 8,25. Στην καρβοξυτελική περιοχή, υπάρχουν πολλά κατάλοιπα σερίνης, τα οποία αποτελούν πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης (N. Blom, 1999). Με πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυτάρων *HeLa* και *COS-7* και εντοπισμού της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με μικροσκόπιο φθορισμού έχει δειχθεί ότι το πρωτεϊνικό προϊόν του κύριου μεταγράφου, εντοπίζεται στον πυρήνα (Εικόνα 1.1). Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (στις αμινοξικές θέσεις 223-238 και 245-262) που φέρει η πρωτεΐνη (αναγνωρίστηκε από προγράμματα πρόβλεψης).



**Εικόνα 1.1.:** Υποκυτταρικός εντοπισμός της χιμαιρικής πρωτεΐνης *FRA10AC1*-GFP στον πυρήνα, με μικροσκόπιο φθορισμού. Το κύτταρο που απεικονίζεται είναι της σειράς *COS-7* και έχει διαμολυνθεί παροδικά με το αντίστοιχο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (Sarafidou *et al.* 2004).

Ορθόλογες πρωτεΐνες της FRA10AC1 εντοπίζονται σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς τόσο του ζωϊκού όσο και του φυτικού βασιλείου, γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανόν υπήρξε κάποιο προγονικό γονίδιο πριν το διαχωρισμό των φυτών και των ζώων, το οποίο στη συνέχεια διαφοροποιήθηκε. Οι ορθόλογες πρωτεΐνες παρουσιάζουν σημαντική ομοιότητα, κυρίως στην κεντρική περιοχή τους (105-240 αα) σε ποσοστό που κυμαίνεται από 45% έως 67%, γεγονός που αποτελεί ένδειξη μιας υψηλά συντηρημένης επικράτειας, η οποία πιθανόν επιτελεί μια σημαντική λειτουργία. Επιπλέον, το γεγονός ότι η πρωτεΐνη δεν εντοπίζεται σε προκαρυωτικούς οργανισμούς, πιθανώς υποδεικνύει ότι σχετίζεται με μία λειτουργία που αφορά αποκλειστικά τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Sarafidou *et al.* 2004).

Δεδομένου αφ' ενός ότι δεν είναι γνωστή η βιολογική λειτουργία καμιάς από τις ορθόλογες πρωτεΐνες και αφ' ετέρου ότι η FRA10AC1 δεν διαθέτει κάποιο χαρακτηριστικό μοτίβο, οι πληροφορίες σχετικές με τις αλληλεπιδράσεις της FRA10AC1 με άλλα πρωτεϊνικά μόρια είναι σημαντικές για τη διαλεύκανση του βιολογικού της ρόλου. Σε αυτό το πλαίσιο, με το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα και με πειράματα συνκατακρήμνισης (pull-down) ταυτοποιήθηκε ότι η FRA10AC1 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες DGCR14 και SAP145. Ειδικότερα για τις πρωτεΐνες FRA10AC1 και DGCR14 προσδιορίστηκαν με πειράματα συνκατακρήμνισης οι αντίστοιχες περιοχές που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση. Έτσι, δείχθηκε ότι η τμήμα της FRA10AC1 που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 96-253 είναι αναγκαίο και επαρκές για την πρόσδεση με την DGCR14. Αυτή η περιοχή αντιστοιχεί στο τμήμα με το υψηλότερο ποσοστό συντήρησης μεταξύ των ορθολόγων μορίων και ταυτόχρονα περιλαμβάνει το μεγαλύτερο τμήμα του θεωρητικού σήματος πυρηνικού εντοπισμού. Η επικράτεια της DGCR14 η οποία είναι ικανή να αλληλεπιδρά με την FRA10AC1 περιλαμβάνεται στην αμινοξική ακολουθία 294-472, ενώ η ακολουθία 317-390 είναι απαραίτητη για την πρόσδεση μεταξύ των πρωτεϊνών. Το τμήμα αυτό περιέχει μια επικράτεια με διαμόρφωση σπειράματος, μοτίβο το οποίο σχετίζεται με πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (Burkhard *et al* 2001). Επιπλέον, με πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης δείχθηκε ότι αυτές οι δύο πρωτεΐνες βρίσκονται στο ίδιο σύμπλοκο *in vivo*, σε κύτταρα *HeLa*.

Η λειτουργία της SAP145 έχει χαρακτηριστεί και ειδικότερα, αυτή η πρωτεΐνη αποτελεί μια από τις τέσσερις υπομονάδες του παράγοντα συναρμογής SF3b (οι άλλες τρεις υπομονάδες είναι οι SAP49, SAP130 και SAP155), ο οποίος είναι απαραίτητος για την ωρίμανση του πρόδρομου mRNA. Με βιοχημικά πειράματα έχει δειχθεί ότι η αλληλεπίδραση του παράγοντα συναρμογής SF3b με το μικρό πυρηνικό ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σωματίο 12S U2 snRNP είναι απαραίτητη για τη συνακόλουθη ενσωμάτωση του παράγοντα συναρμογής SF3a στο σύμπλοκο, ώστε

να σχηματιστεί το μικρό πυρηνικό ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σωματίο 17S U2 snRNP, το οποίο αποτελεί μια από τις βασικές υπομονάδες του σωματίου συναρμογής (Krämer A *et al.* 1999).

Το γονίδιο *DGCR14* κλωνοποιήθηκε αρχικά λόγω της χαρτογράφησης του στην κρίσιμη περιοχή για τα σύνδρομα DiGeorge και VCF (22q11.2). Είναι ένα υψηλά συντηρημένο γονίδιο (Gong W *et al.* 1997) το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, η άγνωστης λειτουργίας. Με ανάλυση Northern έχει δειχθεί ότι το γονίδιο εκφράζεται σε όλους τους ιστούς του ενήλικα ανθρώπου και ποντικού, ενώ σε έμβρυα ποντικού το γονίδιο μεταγράφεται από τα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης (Lindsay E *et al.* 1998). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι και η πρωτεΐνη *DGCR14* φαίνεται πως σχετίζεται με τη διαδικασία της συναρμογής. Συγκεκριμένα, έχει ταυτοποιηθεί σε τρία διαφορετικά βιοχημικά πειράματα απομόνωσης των πρωτεϊνών του σωματίου συναρμογής ως συστατικό του συμπλόκου C (Bessonov *et al.*, 2008). Μάλιστα, στη μελέτη των Bessonov *et al.* (2008), η πρωτεΐνη *FRA10AC1* ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά ως συστατικό του ίδιου συμπλόκου. Τα παραπάνω δεδομένα, σε συνδυασμό με τον πυρηνικό εντοπισμό και την παρουσία ορθολόγων σε ευκαρυώτες, συνηγορούν υπέρ της συμμετοχής της *FRA10AC1* στη διαδικασία της συναρμογής ή/και πιθανώς σε άλλες στενά συσχετιζόμενες λειτουργίες, όπως η μεταγραφή και η έξοδος του mRNA από τον πυρήνα. Η συναρμογή λαμβάνει χώρα είτε κατά τη διάρκεια της μεταγραφής (συν-μεταγραφική συναρμογή) είτε μετά το πέρας αυτής (μετα-μεταγραφική συναρμογή). Στην πρώτη περίπτωση, η συναρμογή συνδέεται λειτουργικά με τη μεταγραφή καθώς ρυθμίζεται μέσω μεταγραφο-εξαρτώμενων μηχανισμών, ενώ στη δεύτερη περίπτωση στη ρύθμιση συμμετέχουν πιθανόν και άλλοι μηχανισμοί οι οποίοι συνδέουν τη συναρμογή με καθοδικά γεγονότα, όπως η έξοδος του mRNA από τον πυρήνα (Han J *et al.* 2011).

#### **1.4. Λειτουργική ανάλυση του γονιδίου *FRA10AC1***

Οι υπάρχουσες πληροφορίες για τη λειτουργία της πρωτεΐνης *FRA10AC1* είναι περιορισμένες. Είναι γνωστό ότι εντοπίζεται στον πυρήνα, εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και ότι υπάρχουν ορθολογες πρωτεΐνες σε όλους τους πολυκύτταρους ευκαρυώτες. Επίσης, έχει ταυτοποιηθεί ότι η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες *SAP145* και *DGCR14* που αποτελούν συστατικά του σωματίου συναρμογής. Συνδυάζοντας τα παραπάνω δεδομένα, η *FRA10AC1* πιθανόν συμμετέχει στη διαδικασία της συναρμογής ή σε κάποια άλλη στενά συσχετιζόμενη διαδικασία. Ωστόσο, οι πληροφορίες αυτές δεν είναι επαρκείς για τον προσδιορισμό του βιολογικού της ρόλου. Για αυτό τον σκοπό μπορούν να ακολουθηθούν διάφορες

προσεγγίσεις. Σε επίπεδο οργανισμού, μπορεί να παραγματοποιηθεί knock-out του γονιδίου σε οργανισμούς-μοντέλα και να μελετηθεί ο φαινότυπος ώστε να ελεγχθεί η υπόθεση της συσχέτισης του γονιδίου με το φαινότυπο της νοητικής υστέρησης που έχει αναφερθεί σε άτομα-φορείς της *FRA10A*. Σε προσέγγιση *in silico*, θα μπορούσε να μελετηθεί η τοπολογία της *FRA10AC1* στο σωματίο συναρμογής μέσω προσδιορισμού περαιτέρω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων ώστε να συναχθούν συμπεράσματα σχετικά με το ρόλο και τη σημασία της για τη δυναμική και τη λειτουργία αυτού του συμπλόκου. Στη συνέχεια, οι προβλεπόμενες αλληλεπιδράσεις θα μπορούσαν να ελεγχθούν πειραματικά *in vitro*. Επίσης, θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν διάφορα βιοχημικά πειράματα για τη διαλεύκανση του ρόλου της πρωτεΐνης στη διαδικασία της συναρμογής, όπως απομάκρυνσης ή υπερέκφρασης της πρωτεΐνης και περαιτέρω μελέτη της κινητικής της αντίδρασης. Τέλος, πολύτιμες πληροφορίες θα προέκυπταν και από την ανάλυση ενός κυτταρικού μοντέλου υπερέκφρασης ή καταστολής του γονιδίου *FRA10AC1* και περαιτέρω μελέτη του συστήματος σε όλα τα επίπεδα κυτταρικής λειτουργίας (γονιδίωμα, μεταγράψωμα, πρωτεϊνωμα, μεταβόλωμα), μεμονωμένα ή συνδυαστικά. Η παρούσα εργασία εντάσσεται στην τελευταία προσέγγιση και ειδικότερα στοχεύει στην προκαταρκτική μεταβολομική μελέτη της υπερέκφρασης του γονιδίου σε κυτταρική σειρά ανθρώπου. Σε αυτό το πλαίσιο, αναφέρονται στη συνέχεια εισαγωγικά στοιχεία σχετικά με τις «ομικές» τεχνολογίες και ειδικότερα με προσεγγίσεις της μεταβολομικής.

### **1.5. Λειτουργική ανάλυση γονιδίων σε κυτταρικό επίπεδο με «ομικές» τεχνολογίες**

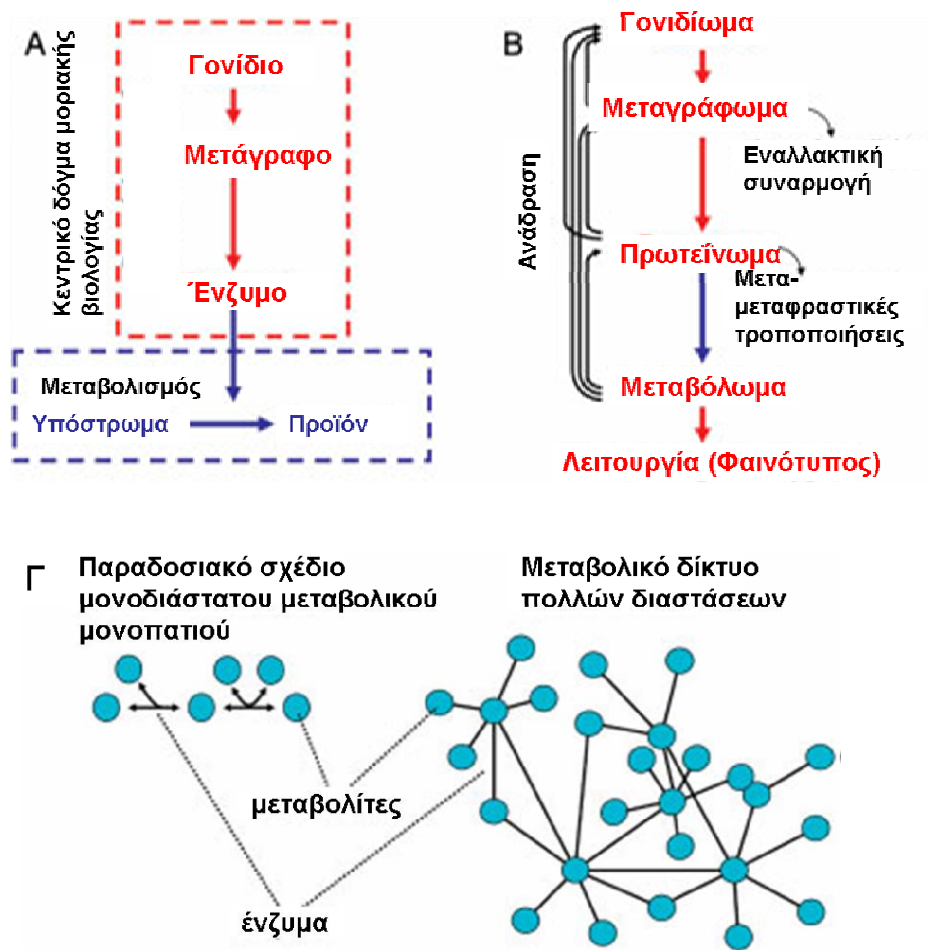
Στη μεταγονιδιωματική εποχή, η ανάπτυξη τεχνολογιών υψηλής απόδοσης, που αναφέρονται ως «ομικές» τεχνολογίες, επιτρέπει τη μελέτη διαφόρων επιπέδων κυτταρικής λειτουργίας σε ευρεία κλίμακα. Κατ' αντιστοιχία με τη χρήση των μεθόδων αλληλούχησης σε μεγάλη κλίμακα, η οποία οδήγησε στην αλληλούχηση ολόκληρων γονιδιωμάτων, η ανάπτυξη της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών επιτρέπει την ποσοτικοποίηση όλων των μεταγράφων ενός κυττάρου ταυτόχρονα. Αναλόγως, οι υψηλά αυτοματοποιημένες τεχνολογίες της πρωτεωμικής και μεταβολομικής επιτρέπουν την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των κυτταρικών πρωτεϊνών και μεταβολιτών, αντίστοιχα (Fischer HP., 2005). Τα βιομόρια αυτά αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας πολύπλοκα δίκτυα (μεταγραφικά, πρωτεϊνικά, μεταβολικά).

Σε αντίθεση με το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας της δεκαετίας του '50, που πρεσβεύει τη ροή πληροφοριών προς τη μία μόνο κατεύθυνση, σήμερα είναι

γνωστό ότι οι λειτουργίες του κάθε επιπέδου είναι αποτέλεσμα της δυναμικής αλληλεπίδρασης με τα υπόλοιπα επίπεδα (Εικόνα 1.2). Η μελέτη ενός μόνο γονιδίου, μεταγράφου, πρωτεΐνης, μεταβολίτη, αγνοώντας τον τρόπο με τον οποίο ενδεχομένως αλληλεπιδρά με άλλα βιομόρια στο ίδιο και στα υπόλοιπα επίπεδα, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια πολύτιμης πληροφορίας για τη λειτουργία του εκάστοτε βιομορίου (K. Hollywood, 2006). Για την ανάλυση της λειτουργίας του πρωτεϊνικού προϊόντος ενός γονιδίου είναι απαραίτητος ο συνδυασμός των πληροφοριών που μπορούν να αντληθούν από κάθε ολιστικό πρότυπο (J. Nielsen, 2003).

Η μεταγραφή ενός γονιδίου καθορίζεται από τη συγκέντρωση των μεταγραφικών παραγόντων και την δραστικότητα σηματοδοτικών μορίων και κυτταρικών υποδοχέων. Αναλόγως, η συγκέντρωση μιας πρωτεΐνης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αντίστοιχου μεταγράφου αλλά και από την ενεργότητα άλλων πρωτεϊνών, όπως φωσφατάσες, πρωτεάσες ή πρωτεΐνες της μεταφραστικής συσκευής. Οι μεταβολικές συγκεντρώσεις εξαρτώνται από την ενεργότητα όλων των ενζύμων που συμμετέχουν στις μεταβολικές διεργασίες, τα οποία αποτελούν συστατικά του πρωτεϊνώματος, του προηγούμενου επιπέδου. Καθώς οι μεταβολίτες συμμετέχουν συνήθως σε πολλές αντιδράσεις, δημιουργώντας πολύπλοκα δίκτυα, ακόμη και οι μικρές αλλαγές στο επίπεδο του πρωτεϊνώματος μπορούν να έχουν σημαντικές επιδράσεις στο μεταβολικό πρότυπο. Έτσι, οι λειτουργίες του μεταβολώματος, μέσω του οποίου μάλιστα το κύτταρο «επικοινωνεί» με το περιβάλλον, αποτελούν σε μεγάλο βαθμό την ενοποίηση των λειτουργιών των άλλων επιπέδων, καθιστώντας την μεταβολομική ισχυρό εργαλείο στην ανάλυση του κυτταρικού φαινοτύπου (J. Nielsen, 2005). Ανακεφαλαιώνοντας, η συνδυαστική μέτρηση των συστατικών του μεταγραφώματος, πρωτεϊνώματος και μεταβολώματος σε διάφορες κυτταρικές καταστάσεις (π.χ παθολογικές) επιτρέπουν την δημιουργία ακριβέστερων μοντέλων για την διερεύνηση της κυτταρικής λειτουργίας (Lin & Qian 2007).





**Εικόνα 1.2.:** Α) Το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας. Η πληροφορία ρέει μονόδρομα από το γονίδιο στο μετάγραφο και από το μετάγραφο στην πρωτεΐνη. Απεικονίζεται επίσης το σημείο στο οποίο δρουν τα ένζυμα που συμμετέχουν στον μεταβολισμό. Β) Η νέα και αποδεκτή πλέον αντίληψη ροής πληροφοριών, σύμφωνα με την ολιστική προσέγγιση των «ομικών» τεχνολογιών. Τα διάφορα επίπεδα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με μηχανισμούς ανάδρασης. Γ) Η παραδοσιακή γραμμική αντίληψη για τη συσχέτιση των μεταβολιτών και η νέα αντίληψη των αλληλεπιδράσεων σε ένα μεταβολικό δίκτυο. Οι κόμβοι αναπαριστούν μεταβολίτες, ενώ οι γραμμές ενζυμικές αντιδράσεις (Hollywood K. *et al.*, 2006).

## 1.6. Μεταβολομική (Metabolomics)

Μετά τη γονιδιωματική επανάσταση, η μεταβολομική (metabolomics) αποτελεί μια από τις πιο πρόσφατες «ομικές» τεχνολογίες. Ο όρος μεταβολομική (metabolomics) επινοήθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1990 για να περιγράψει την ανάπτυξη προσεγγίσεων, οι οποίες στοχεύουν στη μέτρηση όλων των μεταβολιτών που βρίσκονται σε ένα κύτταρο, ιστό ή οργανισμό (Oliver *et al.*, 1998), ενώ ως μεταβονομική (metabonomics) ορίστηκε η ανάλυση των μεταβολικών αποκρίσεων σε φάρμακα ή ασθένειες (Nicholson *et al.*, 1999). Σήμερα, οι δύο όροι χρησιμοποιούνται

πλέον εναλλακτικά για να περιγράψουν την πολυσύνθετη ανάλυση των μεταβολιτών σε ένα σύστημα (Beckonert, O. et al., 2007).

Το 1998, διατυπώθηκε για πρώτη φορά η ιδέα της εφαρμογής μεταβολομικής ανάλυσης στο πεδίο της λειτουργικής γονιδιωματικής από τον Oliver *et al.*, ενώ οι Tweeddale *et al.* πρότειναν τη μεταβολομική ανάλυση ως εργαλείο για τον προσδιορισμό του φαινοτύπου σε κύτταρα *Escherichia coli*. Λίγα χρόνια μετά, το 2001, ο Fiehn εισήγαγε πιο ακριβείς ορολογίες για διάφορες προσεγγίσεις στην μέτρηση μεταβολιτών. Κατά τους Jens Nielsen και Stephen Oliver (2005), οι οποίοι επέκτειναν τους ορισμούς του Fiehn, ως μεταβόλωμα ορίζεται το σύνολο των μεταβολιτών (μορίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό), οι οποίοι παράγονται από ένα κύτταρο. Συνίσταται στο ενδομεταβόλωμα, το οποίο περιλαμβάνει τους ενδοκυττάριους μεταβολίτες, και το εξωμεταβόλωμα, το οποίο αποτελείται από μεταβολίτες που εκκρίνονται στο εξωκυττάριο υγρό ή στο θρεπτικό ανάπτυξης. Ο όρος μεταβολικό αποτύπωμα (metabolite fingerprinting) αναφέρεται σε φάσματα αναλύσεων NMR ή φασματομετρίας μαζών, τα οποία παρέχουν πληροφορίες για το «αποτύπωμα» των μεταβολιτών που παράγονται από το κύτταρο, όχι όμως συγκεκριμένων μεταβολιτών. Αντίθετα, η ανάλυση μιας ομάδας συγκεκριμένων μεταβολιτών (π.χ. υδρογονάνθρακες, αμινοξέα) ονομάζεται μεταβολικό πρότυπο (metabolite profiling) και είναι συνήθως ημιποσοτική ενώ, η ποσοτική ανάλυση μεταβολιτών που λαμβάνουν μέρος σε ένα συγκεκριμένο μονοπάτι του μεταβολισμού αναφέρεται ως στοχευμένη ανάλυση μεταβολιτών (metabolite target analysis) (Nielsen και Oliver, 2005).

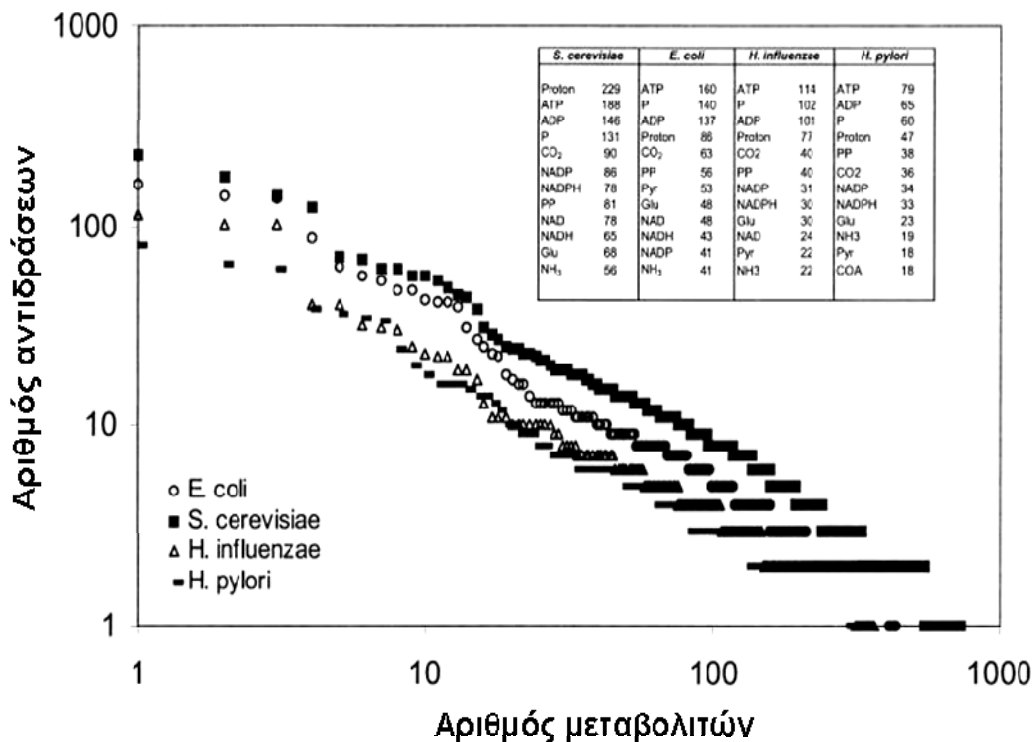
Η ταυτότητα, οι συγκεντρώσεις και οι διακυμάνσεις των συστατικών του μεταβολώματος είναι συνέπεια μιας πολύπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ της γονιδιακής έκφρασης, της παραγωγής πρωτεϊνών και της επίπτωσης των περιβαλλοντικών παραγόντων. Το μεταβόλωμα αντιπροσωπεύει το αποτέλεσμα των στενά συνδεδεμένων λειτουργιών του γονιδιώματος, του μεταγραφώματος και του πρωτεϊνώματος και αλληλεπιδρά με αυτά. Κατά συνέπεια, τα δεδομένα που παρέχει η μεταβολομική θέτουν σε ένα ενιαίο σύνολο τις πληροφορίες που προέρχονται από τα υπόλοιπα πεδία, της γονιδιωματικής, μεταγραφωματικής και πρωτεϊνωματικής αποτελώντας πλέον αναπόσπαστο κομμάτι της συστημικής βιολογίας.

Σε αντίθεση με την κλασική βιοχημική προσέγγιση, η οποία εστιάζει συνήθως στις κινητικές ιδιότητες και τους κύκλους μεμονωμένων μεταβολιτών (π.χ. πρόδρομα μόρια, προϊόντα, ενδιάμεσος μεταβολισμός κτλ.), η μεταβολομική αποσκοπεί σε μια πιο σφαιρική κατανόηση του μεταβολισμού, αξιοποιώντας τη συλλογή ποσοτικών δεδομένων μιας ευρείας σειράς μεταβολιτών. Ιδανικά, στόχος της μεταβολομικής είναι η δημιουργία ενός χάρτη που αποτυπώνει τη ρύθμιση όλων των μεταβολικών

μονοπατιών και κατ' επέκταση την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα και εκφράζονται υπό ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Συνεπώς, το μεταβόλωμα αντιπροσωπεύει μια κατάσταση λειτουργίας σε μια δεδομένη χρονική στιγμή ή μετά από έκθεση σε ένα περιβαλλοντικό ερέθισμα (Kaddurah-Daouk R et al., 2008).

Οι μεταβολικές αντιδράσεις σε ένα κύτταρο συνδέονται στενά μεταξύ τους, δημιουργώντας ένα πολύπλοκο μεταβολικό δίκτυο. Στο σακχαρομόκητα, ποσοστό μικρότερο από 30% των μεταβολικών συμμετέχουν σε μόνο δύο αντιδράσεις, ~12% εμπλέκεται σε περισσότερες από δέκα αντιδράσεις και ~4% σε περισσότερες από είκοσι. Επιπλέον, σε ποσοστό μεγαλύτερο του 67% των αντιδράσεων ενέχονται περισσότερα από ένα υποστρώματα και προϊόντα (Förster, J. et al., 2003, Nielsen και Oliver, 2005). Έτσι, η διακύμανση ενός μεταβολίτη έχει αντίκτυπο και σε άλλα μέρη του μεταβολισμού, προκαλώντας με τον τρόπο αυτό μια συνολική κυτταρική απόκριση. Επομένως, είναι δυνατόν να εξαχθεί πολύτιμη πληροφορία για την λειτουργία ενός ολόκληρου μεταβολικού δικτύου από την μέτρηση ακόμη και μερικών μόνο μεταβολικών διακυμάνσεων. Η πολυπλοκότητα και η ισχυρή αλληλεπίδραση των μορίων ενός μεταβολικού δικτύου παρουσιάζεται ενδεικτικά στην Εικόνα 1.3 (Nielsen J., 2003).

Το μέγεθος του μεταβολώματος στον άνθρωπο, παραμένει υπό διερεύνηση και εξαρτάται από το ποιοι μεταβολίτες προσδιορίζονται ως απαραίτητοι προς ανάλυση. Κατά καιρούς, έχει προταθεί η ανάλυση μερικών χιλιάδων έως δεκάδων χιλιάδων (Kaddurah-Daouk R. et al., 2008). Κατά τον Beecher (2003), η μέτρηση 2.000 μεταβολιτών στον άνθρωπο είναι ένας ικανοποιητικός αριθμός. Ωστόσο, αν προστεθούν και οι δευτερογενείς μεταβολίτες, μερικοί από τους οποίους μπορεί να έχουν μεγάλη βιολογική σημασία, ο αριθμός αυτός αυξάνεται δραματικά, ενώ στο φυτικό βασίλειο οι μεταβολίτες ξεπερνούν τους 200.000 (Weckwerth, 2003). Είναι λοιπόν εμφανές ότι η μεταβολομική ανάλυση αποτελεί μια μεγάλη επιστημονική πρόκληση. Ωστόσο, δεν έχει ακόμα αναπτυχθεί κάποια μέθοδος, ικανή να αναλύσει ταυτόχρονα όλους τους μεταβολίτες ενός συστήματος (Dettmer K, 2007).



**Εικόνα 1.3:** Διάγραμμα συχνοτήτων των αντιδράσεων στις οποίες συμμετέχει ο κάθε μεταβολίτης στα μεταβολικά δίκτυα τεσσάρων οργανισμών. Στον πίνακα (πάνω δεξιά) καταγράφονται οι 10 μεταβολίτες που εμπλέκονται στις περισσότερες αντιδράσεις, ο αριθμός των οποίων αναγράφεται δίπλα στο όνομα του κάθε μεταβολίτη. PP: πυροφωσφορικό (pyrophosphate), COA: συνένζυμο A (coenzyme A), (Nielsen, J. 2003).

## 1.7. Μεθοδολογία και τεχνικές της μεταβολομικής

### ➤ Τα στάδια σε μια μεταβολομική μελέτη

Μια μεταβολομική μελέτη περιλαμβάνει τέσσερα βασικά στάδια: συλλογή δείγματος, αποθήκευση, απομόνωση μεταβολιτών από το δείγμα και τέλος, μεταβολομική ανάλυση και ερμηνεία αποτελεσμάτων (Kaddurah-Daouk R, 2008). Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμηση μεταβολιτών μετά τη συλλογή του δείγματος, η οποία συμβαίνει λόγω της ενεργότητας διαφόρων ενζύμων ή λόγω οξειδωτικών διαδικασιών (Dettmer et al., 2007). Έτσι, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες τεχνικές για τη διακοπή του μεταβολισμού κατά την συλλογή, όπως απλή κατάψυξη του δείγματος ή κατάψυξη σε υγρό άζωτο, κατεργασία με οξύ (Theobald et al., 1993) ή συλλογή σε διάλυμα μεθανόλης με άλας σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (Maharjan & Ferenci, 2003). Ως δείγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν βιολογικά υγρά (πλάσμα, ούρα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό κλπ.), κύτταρα και ιστοί. Μετά τη συλλογή των δειγμάτων, εξάγονται από αυτά μικρά μόρια,

τα οποία στη συνέχεια διαχωρίζονται (στην περίπτωση μεθόδων που χρησιμοποιούν χρωματογραφία), ταυτοποιούνται και αν είναι δυνατόν, ποσοτικοποιούνται με τη χρήση αναλυτικών τεχνικών.

Τα πρωτογενή δεδομένα που εξάγονται χρειάζονται επεξεργασία πριν την τελική ανάλυση, μια διαδικασία αρκετά απαιτητική, η οποία υποστηρίζεται από τη χρήση λογισμικού (Styczynski MP, 2007) και ακολουθεί η ανάλυση των δεδομένων με μια πληθώρα ισχυρών εργαλείων βιοπληροφορικής (Kaddurah-Daouk R, 2008). Οι προσεγγίσεις που έχουν αναπτυχθεί για την ανάλυση δεδομένων χωρίζονται σε δύο γενικές κατηγορίες: την ποιοτική και την ποσοτική ανάλυση. Στην πρώτη περίπτωση, χρησιμοποιούνται ολόκληρα φάσματα και η ανάλυση βασίζεται στη διερεύνηση διαφορών μεταξύ των μεταβολικών προτύπων, χωρίς να προηγείται η ταυτοποίηση του κάθε μεταβολίτη. Στην ποσοτική ανάλυση, οι μεταβολίτες που αναλύονται, πρώτα ταυτοποιούνται και στη συνέχεια ο καθένας ποσοτικοποιείται (Cyperloniό-Culf M, 2010).

#### ➤ Τεχνικές μεταβολομικής ανάλυσης

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για μεταβολομική ανάλυση βασίζονται κυρίως στη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR Spectroscopy) και στη φασματομετρία μάζας (mass spectrometry, MS). Η φασματοσκοπία NMR είναι μη καταστρεπτική μέθοδος και εύκολη στο χειρισμό (MP. Quinones, 2009, M. Mayr, 2011). Στη φασματομετρία μάζας, πριν την ανάλυση των μεταβολιτών πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των βιολογικών δειγμάτων με χρωματογραφία, συνήθως χρωματογραφία αερίων ή υγρή χρωματογραφία. Ο συνδυασμός με χρωματογραφικές μεθόδους καθιστά τη φασματομετρία μάζας ισχυρό εργαλείο στη μεταβολομική ανάλυση. Η χρωματογραφία αερίων-φασματομετρία μάζας (gas chromatography, GC- MS) και η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (liquid chromatography, LC- MS) χαρακτηρίζονται από υψηλότερη ευαισθησία (σε σχέση με τη φασματοσκοπία NMR) στην ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση πληθώρας μεταβολιτών (K. Dettmer, 2007).

### 1.8. Εφαρμογές της Μεταβολομικής

Μια από τις πρώτες εφαρμογές της μεταβολομικής ήταν στο πεδίο της λειτουργικής γονιδιωμικής, ως ένα εργαλείο για τον προσδιορισμό του φαινοτύπου σε μεταλλάγματα φυτών, ζώων και μικροβίων (Fiehn et al. 2000, Gavaghan et al. 2000, Raamsdonk et al. 2001, Jones et al. 2005). Όπως έχει αναφερθεί ήδη, οι μεταβολικές διακυμάνσεις που λαμβάνουν χώρα σε ένα κύτταρο είναι αποτέλεσμα

της ρύθμισης σε διάφορα επίπεδα (π.χ. γονιδίωμα, μεταγράφημα, πρωτεΐνωμα) και αντιπροσωπεύουν τον κυτταρικό φαινότυπο που εκφράζεται υπό συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες (J. Nielsen, 2003). Όσον αφορά στην ανάλυση ενός γονιδίου με άγνωστη λειτουργία, απαιτείται ο συνδυασμός των δεδομένων που παρέχει η μεταβολομική με τις πληροφορίες των πεδίων της γονιδιωματικής, μεταγραφικής και πρωτεωμικής (J. Nielsen, 2002). Ωστόσο, αν και η μεταβολομική ανάλυση δεν είναι εύκολο να δώσει απαντήσεις για τη λειτουργία ενός γονιδίου από μόνη της, είναι μια ελκυστική μέθοδος για προκαταρκτικές μελέτες καθώς μπορεί να φανερώσει αν προκαλούνται μεταβολικές διακυμάνσεις ή όχι μετά από γενετικές τροποποιήσεις, όπως η απαλοιφή ενός γονιδίου (J. Nielsen, 2003).

Αξιοσημείωτη είναι η συμβολή της μεταβολομικής στη λειτουργική γονιδιωματική και τη συστημική βιολογία των φυτών (Fiehn O., 2002, S Rochfort, 2005), τα οποία περιλαμβάνουν πάνω από 200.000 μεταβολίτες (Weckwerth, 2003). Προσφέρει την δυνατότητα ανάλυσης μεγάλων βιβλιοθηκών με μεταλλάγματα φυτών-μοντέλων (π.χ. *Arabidopsis thaliana*) ενώ η χρήση της για φαινοτυπικό προσδιορισμό έχει βιομηχανικές εφαρμογές (E Fukusaki, A Kobayashi, 2005). Η ανάλυση μεταβολιτών έχει εφαρμοστεί στη διάκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών εμπορικών φυτών, όπως το καλαμπόκι (Manetti C., 2004) και γενικότερα η διερεύνηση της σχέσης μεταβολικών χαρακτηριστικών και γονιδίων είναι σημαντική για την παραγωγή διαγονιδιακών φυτών οικονομικής σημασίας (E Fukusaki, A Kobayashi, 2005).

Στο πεδίο της υγείας του ανθρώπου, οι μεταβολομικές μελέτες υπόσχονται πολλά προς την κατεύθυνση της εξατομικευμένης ιατρικής. Μια αξιόλογη εφαρμογή, η οποία έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, είναι η ταυτοποίηση διαγνωστικών δεικτών για μεγάλο εύρος ασθενειών (S Rochfort, 2005). Μεταξύ των πολλών παραδειγμάτων που μπορούν να αναφερθούν είναι η επιτυχής διάγνωση στεφανιαίας νόσου με χρήση μεταβολικών προτύπων (Brindle, J. T, 2002), η διάγνωση του συνδρόμου Lesch-Nyhan, μιας σοβαρής νοητικής διαταραχής (Ohdoi, C., 2003), καθώς και η σωστή διάκριση γυναικών με καρκίνο των ωοθηκών ως προς υγιή άτομα που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου (Odunsi, K., 2005). Το εύρος των ασθενειών περιλαμβάνει νευρολογικές, ανοσολογικές, καρδιολογικές διαταραχές, ιογενείς λοιμώξεις και διάφορα είδη καρκίνων. Η βασική ιδέα στη χρήση της μεταβολομικής ως εργαλείο στην ανεύρεση βιοδεικτών είναι ότι μεταβολίτες που είναι ειδικοί/χαρακτηριστικοί για ασθένειες εκκρίνονται σε διάφορα σωματικά υγρά, στα οποία μπορούν να ποσοτικοποιηθούν, μετά από λήψη δείγματος (A Nordström, R Lewensohn, 2010). Εκτός από την ανακάλυψη διαγνωστικών δεικτών, πεδίο έντονης έρευνας αποτελεί και η ανακάλυψη προγνωστικών δεικτών για την απόκριση

των ασθενών σε φάρμακα, καθώς και δεικτών για την παρακολούθηση της θεραπείας.

Η μεταβολομική έχει συνεισφέρει σημαντικά στην ανάπτυξη φαρμάκων. Πρώτον, συνεισφέρει σημαντικά στην κατανόηση της λειτουργίας βιοχημικών μονοπατιών, οδηγώντας έτσι σε ταυτοποίηση νέων φαρμακευτικών στόχων. Δεύτερον, αποτελεί ισχυρό εργαλείο στην αναγνώριση δεικτών της τοξικότητας φαρμάκων σε προκλινικές δοκιμές (A Nordström, R Lewensohn, 2010). Ένα σπουδαίο πρόγραμμα σε αυτόν το χώρο είναι το *Consortium for Metabonomic Toxicology (COMET)*, μια συνεργασία ανάμεσα σε ερευνητές και φαρμακευτικές εταιρίες, η οποία φιλοδοξεί να δημιουργήσει μια βάση δεδομένων με φάσματα  $H^1$ -NMR από ανάλυση ούρων και αίματος τρωκτικών, με απώτερο σκοπό την κατασκευή ενός προγνωστικού μοντέλου για την τοξικότητα που εμφανίζεται σε ορισμένα όργανα ως απόκριση σε φάρμακα (Lindon et al. 2005).

### **1.9. Μεταβολομική ανάλυση σε κυτταροκαλλιέργειες**

Οι μεταβολομικές μελέτες που σχετίζονται με τη βιολογία του ανθρώπου έχουν εστιαστεί κυρίως στην ανάλυση σωματικών υγρών. Υπάρχει μια πληθώρα δημοσιεύσεων, στις οποίες η ανάλυση μεταβολιτών πραγματοποιείται σε διάφορα σωματικά υγρά με σκοπό ποικίλες κλινικές εφαρμογές (Nordström A, Lewensohn R, 2010). Έτσι, ο αριθμός των δημοσιεύσεων που αφορούν στην εφαρμογή της μεταβολομικής σε καλλιέργειες κυττάρων είναι σημαντικά μικρότερος (Cyperloniό-Culf M, 2010).

Ωστόσο, τα δεδομένα που μπορούν να προέλθουν από την ανάλυση κυτταρικών σειρών είναι κρίσιμης σημασίας για την σφαιρική κατανόηση των ιδιοτήτων και λειτουργιών διάφορων κυτταρικών τύπων. Η ανάλυση κυτταροκαλλιέργειών είναι οικονομικότερη και ευκολότερη στο χειρισμό σε σχέση με τη μελέτη ζωικών μοντέλων ή ανθρώπινων βιολογικών δειγμάτων, ενώ τα βιοηθικά ζητήματα που ενέχονται είναι σαφώς λιγότερα. Επιπλέον, οι διαφορές στην ηλικία, το φύλο, στην έκθεση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα αποτελούν θέματα που περιπλέκουν την ερμηνεία αποτελεσμάτων της μεταβολομικής που εφαρμόζεται σε βιολογικά υγρά διαφόρων ατόμων. Αυτό το πρόβλημα απουσιάζει στην περίπτωση εφαρμογής σε κυτταρικές σειρές. Επίσης οι πληροφορίες που προκύπτουν μπορούν να συνδυαστούν άμεσα με αντίστοιχα δεδομένα που αποκτώνται από μελέτες γονιδιωματικής και πρωτεϊνωματικής σε κύτταρα.

Η μεταβολομική σε κυτταρικές σειρές χρησιμοποιείται για διάφορους σκοπούς, όπως ο προσδιορισμός κυτταρικού φαινοτύπου, η βελτιστοποίηση συνθηκών

κυτταροκαλλιέργειας, η δημιουργία μεταβολικών δικτύων, η ανακάλυψη βιοδεικτών και φαρμακευτικών στόχων και οι τοξικολογικές μελέτες (Cyperlonic-Culf M, 2010). Ανεξάρτητα από το σκοπό για τον οποίο χρησιμοποιείται, η όλη διαδικασία μπορεί να διακριθεί σε πέντε βασικά στάδια: στον πειραματικό σχεδιασμό, την ανάπτυξη κυττάρων, την καταστολή του μεταβολισμού και την απομόνωση των μεταβολιτών από τα κύτταρα, το μεταβολικό προσδιορισμό και την ανάλυση και ερμηνεία των δεδομένων (Cyperlonic-Culf M, 2010).

Ένα σημαντικό ζήτημα είναι οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης, οι οποίες επηρεάζουν τα μεταβολικά δεδομένα που προκύπτουν. Το θρεπτικό μέσο που απαιτείται για βέλτιστη ανάπτυξη ποικίλει από τύπο σε τύπο κυττάρων και μπορεί να περιέχει διαφορετικά επίπεδα γλυκόζης, γλουταμίνης ή θρεπτικών συστατικών και άλλων προσθετικών ουσιών. Αυτά μπορούν να επηρεάσουν το μεταβόλωμα των κυττάρων και για αυτό συνιστάται η χρήση του ίδιου θρεπτικού μέσου, εφ' όσον είναι δυνατόν, σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές οι οποίες αναλύονται συγκριτικά, προκειμένου να μειωθεί η απόκλιση που προκαλεί το θρεπτικό μέσο (Cyperlonic-Culf M, 2010). Επίσης, εκτός από την επίδραση που έχουν στο μεταβολισμό ορισμένα συστατικά των θρεπτικών μέσων (π.χ. οργανικά οξέα, αμινοξέα, εμβρυϊκός ορός μοσχαριού) μπορούν να προκαλέσουν και καταστολή του ιοντισμού μέσω ηλεκτροψεκασμού, προκαλώντας έτσι και τεχνικά προβλήματα στην ανάλυση (MA. Lorenz, 2011). Επίσης, ο εμπλουτισμός του θρεπτικού με ορό μπορεί να επηρεάσει το μεταβολισμό των κυττάρων και τα μεταβολικά πρότυπα που προκύπτουν, ακόμα και αν δεν παρατηρούνται κυτταρικές μορφολογικές αλλαγές (Hartmann M. et al., 2008). Ωστόσο, υπάρχουν έρευνες στις οποίες έχει δειχθεί ότι οι συνθήκες καλλιέργειας και ανάπτυξης των κυττάρων έχουν μικρότερη επίδραση στα μεταβολικά δεδομένα σε σχέση με τις φαινοτυπικές διαφορές των κυττάρων (Meadows, A.L. et al. 2008, Gottschalk, M. et al., 2008).

Η ιδανική μέθοδος προετοιμασίας δειγμάτων στοχεύει στην άμεση καταστολή του μεταβολισμού και στην εξαγωγή όλων των ενδοκυττάρων μεταβολιτών από το κύτταρο. Οι ταχύτερες κυκλικές αλλαγές στη συγκέντρωση των μεταβολιτών καθιστούν απαραίτητη την καταστολή του μεταβολισμού, ώστε το δείγμα να είναι αντιπροσωπευτικό της μεταβολικής κατάστασης της καλλιέργειας (S Dietmair, 2010). Βασική απαίτηση στη μεταβολομική είναι η μέτρηση όσο το δυνατόν περισσότερων μεταβολιτών. Η ανάγκη αυτή δημιουργεί ταυτόχρονα ένα σημαντικό πρόβλημα καθώς οι μέθοδοι απομόνωσης των μεταβολιτών από τα κύτταρα οδηγούν στην απώλεια ορισμένων από αυτούς. Έτσι, αν και στα βιολογικά υγρά η ανάλυση απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος, στα κύτταρα χρειάζεται εξαγωγή των



μεταβολιτών, αφαίρεση των μακρομορίων ή και διαχωρισμό των μεταβολιτών που βρίσκονται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα (Cüperloniό-Culf M, 2010).

Οι ακριβείς μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με την αξιολόγηση μεθόδων για την προετοιμασία δείγματος (καταστολή μεταβολισμού και απομόνωση) από κύτταρα θηλαστικών τα οποία αναπτύσσονται προσκολλώμενα σε επιφάνεια, όπως τα *HeLa*, είναι περιορισμένες. Σε μεταβολομικές μελέτες έχουν περιγραφεί διάφορες διαδικασίες απομόνωσης, στις οποίες ποικίλει ο όγκος και το είδος του διαλύματος (π.χ διάφορα διαλύματα μεθανόλης), ο αριθμός των επαναληπτικών κύκλων απομόνωσης (1- 3) καθώς και η διάρκειά τους (έως 60 min). Επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες διαδικασίες πλύσης (π.χ. με PBS), καταστολής του μεταβολισμού (π.χ. με μεθανόλη) ή θέρμανσης των κυττάρων πριν τη μέτρηση (MA. Lorenz, 2011). Στις περισσότερες μεθόδους χρησιμοποιείται ένας κρύος οργανικός διαλύτης για την καταστολή του μεταβολισμού και την ταυτόχρονη απομόνωση.

Όσον αφορά στην μέτρηση των μεταβολιτών σε κύτταρα, οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται δεν διαφέρουν από αυτές που εφαρμόζονται σε άλλα βιολογικά δείγματα. Αφού απομονωθούν οι μεταβολίτες, διαχωρίζονται (στην περίπτωση μεθόδων που χρησιμοποιούν χρωματογραφία), ταυτοποιούνται και αν είναι δυνατόν ποσοτικοποιούνται, ενώ ακολουθεί η επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων με ισχυρές υπολογιστικές μεθόδους (Cüperloniό-Culf M, 2010).

## 1.10. Σκοπός της εργασίας

Τα μέχρι τώρα δεδομένα σχετικά με τη λειτουργία της πρωτεΐνης FRA10AC1 συνηγορούν υπέρ της συμμετοχής της στη διαδικασία της συναρμογής ή/και σε άλλες στενά συσχετιζόμενες διαδικασίες. Ωστόσο, η ακριβής λειτουργία της παραμένει άγνωστη. Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία αποτελεί τμήμα μιας γενικότερης ερευνητικής προσπάθειας για τη λειτουργική ανάλυση του γονιδίου και του προσδιορισμού του βιολογικού του ρόλου σε κυτταρικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, στοχεύει στον προσδιορισμό του μεταβολικού προτύπου των κυττάρων *HeLa* και στη βελτιστοποίηση της μεθόδου χειρισμού τους, ώστε να πραγματοποιηθεί μελλοντικά η μεταβολομική ανάλυση της υπερέκφρασης και της καταστολής του γονιδίου, η οποία θα συνδυαστεί με αντίστοιχα δεδομένα από τα άλλα επίπεδα κυτταρικής λειτουργίας. Το μεταβολικό πρότυπο της κυτταρικής σειράς *HeLa* αναλύεται για πρώτη φορά και για αυτόν το σκοπό αξιοποιείται η μέθοδος της χρωματογραφίας αερίων-φασματομετρίας μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS).

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## ΥΛΙΚΑ

### 2.1. Καλλιέργεια βακτηρίων

#### Βακτηριακά στελέχη

**BL21 (DE3) CodonPlus:** Χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης FRA10AC1- His. Η αποδοτική έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών στην *E. coli* συχνά περιορίζεται λόγω της μειωμένης αφθονίας ορισμένων αμινοξέων, τα οποία όμως αφθονούν στον οργανισμό στον οποίο παράγεται φυσιολογικά η πρωτεΐνη. Το στέλεχος αυτό επιτρέπει την έκφραση, σε υψηλά επίπεδα, ετερόλογων πρωτεϊνών, καθώς φέρει το πλασμίδιο RIL, το οποίο περιέχει επιπλέον αντίγραφα των γονιδίων που κωδικοποιούν τα tRNAs για τα αμινοξέα αργινίνη, λευκίνη, ισολευκίνη και προλίνη. Επίσης, τα στελέχη αυτά έχουν σε λυσιγονία το φάγο DE3, ο οποίος περιέχει το γονίδιο της πολυμεράσης του RNA T7 υπό τον έλεγχο του υποκινητή lacUV5. Επειδή ο υποκινητής αυτός επάγεται με ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοσίδιο (Isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG), η προσθήκη αυτού σε μετασχηματισμένα κύτταρα με πλασμίδιο που φέρει τον υποκινητή της πολυμεράσης T7 έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφή του γονιδίου που είναι κλωνοποιημένο στο πλασμίδιο. Τέλος, το στέλεχος διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στη χλωραμφαινικόλη.

#### Θρεπτικά

- ❖ **Στερεό θρεπτικό LB:** Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού LB διαλύονται 30g σκόνης LB agar (10g πεπτόνη καζεΐνης, 5g εκχύλισμα ζύμης, 15g άγαρ, Sigma REF: 01- 384) σε 1 lt νερού. Ακολουθεί αποστείρωση, προσθήκη των κατάλληλων αντιβιοτικών όταν η θερμοκρασία του θρεπτικού είναι 45-55°C και προσθήκη σε τρυβλία.
- ❖ **Υγρό θρεπτικό LB:** Για την παρασκευή υγρού θρεπτικού LB διαλύονται 15g σκόνης LB Broth (10g πεπτόνη καζεΐνης, 5g εκχύλισμα ζύμης, Sigma REF: 02- 384) σε 1 lt νερού. Ακολουθεί αποστείρωση και αφού κρυώσει το διάλυμα, προστίθενται τα κατάλληλα αντιβιοτικά.

#### Αντιβιοτικά

- ❖ **Χλωραμφαινικόλη:** προστέθηκε στα διαλύματα των θρεπτικών σε τελική συγκέντρωση 34μg/ml από πυκνό διάλυμα χλωραμφαινικόλης σε απόλυτη αιθανόλη 34mg/ml.
- ❖ **Καναμυκίνη:** προστέθηκε στα διαλύματα των θρεπτικών σε τελική συγκέντρωση 30μg/ml από πυκνό διάλυμα καναμυκίνης σε H<sub>2</sub>O 50mg/ml.

## 2.2. Καλλιέργεια κυττάρων *HeLa*

### Κυτταρική σειρά *HeLa*

Τα *HeLa* είναι επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπου που προέρχονται από αδενοκαρκίνωμα του τραχήλου, τα οποία αναπτύσσονται σχηματίζοντας μονοστοιβάδες. Χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της επίδρασης της τροποποιημένης έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1* σε επίπεδο μεταβολιτών, ενώ επίσης πρωτεϊνικό εκχύλισμά τους χρησιμοποιήθηκε για πείραμα ελέγχου του αντισώματος αντι-*FRA10AC1*. Καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS και αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 100 U/ml και 100 µg/ml αντίστοιχα. Η καλλιέργειά τους έγινε σε επωαστήρα με θερμοκρασία 37°C και 5% CO<sub>2</sub>.

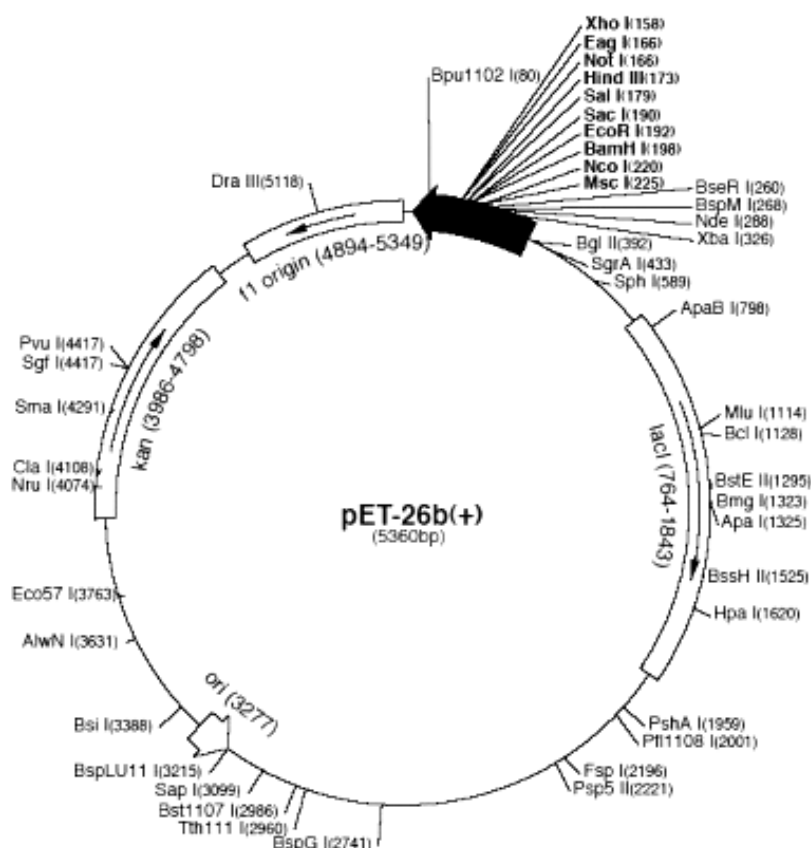
### Διαλύματα για ανάπτυξη και διατήρηση των κυττάρων

- ❖ **Θρεπτικό μέσο DMEM 1X** (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) με 4,5g/L γλυκόζη, L- γλουταμίνη, πυροσταφυλικό οξύ. Είναι το μέσο το οποίο παρέχει στα κύτταρα αμινοξέα, βιταμίνες καθώς και άλλα πρόσθετα συστατικά απαραίτητα για την καλλιέργεια τους. Διατηρείται στους 4° C. (Cat. No.: 41966- 029, GIBCO).
- ❖ **1X PBS** (Phosphate Buffer Saline) pH 7,4 χωρίς CaCl<sub>2</sub> και MgCl<sub>2</sub>. Χρησιμοποιείται κατά τις πλύσεις των κυττάρων, ώστε να διατηρείται σταθερό το pH στο ενδοκυττάριο περιβάλλον. Διατηρείται στους 4° C. (Cat. No.: 10010- 015, GIBCO).
- ❖ **Trypsin- EDTA 0,5%**: Η τρυψίνη χρησιμοποιείται αραιωμένη σε 1X PBS σε τελική συγκέντρωση 0,05% για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια ανάπτυξης κατά την ανακαλλιέργεια. Διατηρείται στους -20° C. (Cat. No.: 15400, GIBCO).
- ❖ **Fetal Bovine Serum (FBS)**: Έχει υψηλή περιεκτικότητα σε εμβρυϊκούς αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τις μεταβολικές διεργασίες των κυττάρων. Προστίθεται σε τελική συγκέντρωση 10% στο θρεπτικό μέσο DMEM. Διατηρείται στους -20° C. (Cat. No.: 10270, GIBCO).
- ❖ **Διάλυμα πενικιλίνης/ στρεπτομυκίνης (Penicyllin/Streptomycin)**: πενικιλίνη 10000 U/ml, στρεπτομυκίνη 10000 µg/ml, χλωριούχο νάτριο 8,5 mg/ml. Προστίθεται σε τελική συγκέντρωση 1% στο θρεπτικό μέσο DMEM (τελική συγκέντρωση πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης 100 U/ml και 100 µg/ml αντίστοιχα). Διατηρείται στους -20° C. (Cat. No.: 15140, GIBCO).

### 2.3. Πλασμιδιακές κατασκευές

#### ❖ *FRA\_1-145\_pET26b(+)*

Η πλασμιδιακή κατασκευή περιλαμβάνει το cDNA του γονιδίου *FRA10AC1*, που κωδικοποιεί τα 145 αμινοτελικά αμινοξέα της αντίστοιχης πρωτεΐνης, στο φορέα έκφρασης σε βακτήρια pET-26b(+) (Εικ. 2.1.) (Σαραφίδου Θ., Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 2005). Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη *FRA10AC1* παράγεται σε σύντηξη με έξι αμινοξέα ιστιδίνης (ετικέτα His) στο C-τελικό της άκρο.



**Εικόνα 2.1:** Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης *pET-26b(+)*. Ο φορέας αυτός επιτρέπει την έκφραση πρωτεΐνης σε υψηλά επίπεδα από την πολυμεράση T7 του RNA. Η αλληλουχία ένθεσης βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή T7. Διαθέτει δύο θέσεις έναρξης αντιγραφής, την *f1* και την *colE1* του *pBR322*, γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμικίνη και κωδικόνια για την παραγωγή της ετικέτας His ([www.novagen.com](http://www.novagen.com)).

#### ❖ *FRA\_full\_pEGFP\_N1*

Η πλασμιδιακή κατασκευή περιλαμβάνει όλο το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του cDNA του γονιδίου *FRA10AC1* στο φορέα έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών



## **ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.5. Καθαρισμός συγγένειας πολυκλωνικού αντισώματος**

Για να είναι δυνατός ο έλεγχος της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης FRA10AC1, χρειάζεται ένα ειδικό αντίσωμα έναντι αυτής. Ο πολυκλωνικός ορός αντι-FRA10AC1, ο οποίος παράχθηκε ύστερα από ανοσοποίηση κουνελιού με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-FRA10AC1<sub>145aa</sub> (Αποστολοπούλου Δ., Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης 2003), περιέχει πληθώρα πρωτεϊνών καθώς και άλλα αντισώματα (όπως αντίσωμα έναντι του επιτόπου GST). Επομένως, το επιθυμητό αντίσωμα πρέπει να απομονωθεί από αυτόν. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με κατάλληλη πλασμιδιακή κατασκευή για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης FRA10AC1<sub>1-145</sub>-His. Ακολούθησε η απομόνωση της πρωτεΐνης με στήλη χρωματογραφίας, ηλεκτροφόρηση και μεταφορά της πρωτεΐνης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και τέλος, πρόσδεση και έκλουση του αντισώματος (βλ. 2.5.1- 2.5.4.). Η FRA10AC1 παράχθηκε σε σύντηξη με την ετικέτα His, καθώς ο ορός δεν αναμένεται να περιέχει αντίσωμα έναντι του επιτόπου His, αφού για την παραγωγή του ορού χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη FRA10AC1- GST.

#### **2.5.1. Παραγωγή και απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βακτήρια**

Η πολύ καλή γνώση της γενετικής και μοριακής βιολογίας του βακτηρίου *Escherichia coli*, το χαμηλό κόστος και η ευκολία στην καλλιέργειά του, καθώς και οι απλοί γενετικοί χειρισμοί που απαιτούνται, καθιστούν την *E. coli* ως το πρώτο σε επιλογή σύστημα έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Ωστόσο, ανάλογα με το μέγεθος και το σκοπό χρήσης της πρωτεΐνης, μπορεί να επιλεγεί διαφορετικό σύστημα έκφρασης (π.χ. κύτταρα θηλαστικών, σακχαρομύκητας). Οι μικρές πρωτεΐνες (< 100 αμινοξέα) εκφράζονται καλύτερα στην *E. coli* σε σχέση με τις μεγαλύτερες, οι οποίες παρουσιάζουν προβλήματα στη σταθερότητα και τη διαλυτότητά τους. Γενικά, στην *E. coli* μπορούν να παραχθούν μεγάλες ποσότητες ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Ωστόσο, τα βακτηριακά κύτταρα δεν διαθέτουν μηχανισμούς μετα-μεταφραστικής τροποποίησης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ετερόλογες πρωτεΐνες να μην παράγονται λειτουργικές, εφόσον αυτές οι τροποποιήσεις είναι απαραίτητες για τη λειτουργία τους (Sambrook and Russell, 2001).

Για την παραγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης FRA10AC1-His (με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό συγγένειας του πολυκλωνικού ορού αντι-FRA10AC1), χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E.coli*. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε το στέλεχος BL21 (DE3) CodonPlus, το οποίο είναι κατάλληλο για έκφραση πρωτεϊνών. Δεκτικά κύτταρα μετασχηματίστηκαν με την πλασμιδιακή κατασκευή *FRA\_1-145\_pET26b(+)* (βλ. 2.3).

#### ❖ **Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων**

Για το μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων ακολουθήθηκαν τα εξής στάδια:

1. Ένα δείγμα δεκτικών κυττάρων του στελέχους *E.coli* BL21 (DE3) CodonPlus μεταφέρθηκε από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  σε πάγο.
2. Αφού ξεπάγωσε (~10min), προστέθηκε στα κύτταρα ~1 ηg από την πλασμιδιακή κατασκευή *FRA\_1-145\_pET26b(+)* (βλ. 2.3).
3. Το δείγμα επώαστηκε για 20 min στον πάγο, προκειμένου το DNA να έρθει σε επαφή με την κυτταρική μεμβράνη.
4. Τα κύτταρα υπέστησαν θερμικό σοκ στους  $42^{\circ}\text{C}$  για 90 sec, ώστε να ανοίξουν οι πόροι της κυτταρικής μεμβράνης και να καταστεί δυνατή η είσοδος του DNA.
5. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν αμέσως στον πάγο (1min).
6. Προστέθηκε 1ml LB και ακολούθησε επώαση για 1h στους  $37^{\circ}\text{C}$ , ώστε να εκφράσουν τα κύτταρα τα αντίστοιχα γονίδια ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό.
7. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 15min σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature, RT) και επιστρώθηκαν σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό LB με καναμυκίνη και χλωραμφαινικόλη σε τελική συγκέντρωση 30μg/ml και 34μg/ml αντίστοιχα. Ακολούθησε η επώασή τους ολονύχτια στους  $37^{\circ}\text{C}$  ώστε να αναπτυχθούν οι αποικίες.

#### ❖ **Παραγωγή πρωτεΐνης σε βακτήρια**

Για την παραγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- 1) Από τις αποικίες των μετασχηματισμένων κυττάρων απομονώθηκαν 4-5 μοναδιαίες με τις οποίες εμβολιάστηκε 100 ml υγρό θρεπτικό μέσο LB με



καναμυκίνη και χλωραμφαινικόλη σε τελική συγκέντρωση 30 µg/ml και 34 µg/ml αντίστοιχα.

- 2) Η υγρή καλλιέργεια επώαστηκε ολονύκτια στους 37°C υπό ανάδευση στις 200rpm.
- 3) Από την καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε 1 ml για τον εμβολιασμό 150 ml θρεπτικού μέσου LB ( x 2), και ακολούθησε επώαση μέχρι την εκθετική φάση ανάπτυξης (οπτική πυκνότητα ~ 0,6).
- 4) Προστέθηκε IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM (από πυκνό διάλυμα 500 mM) και ακολούθησε επαγωγή της έκφρασης για 4 h σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση.
- 5) Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 30 min σε RT.

#### ❖ Απομόνωση πρωτεΐνης με στήλη χρωματογραφίας με υπόστρωμα αγαρόζη-Ni-NTA

Η παραγωγή μιας πρωτεΐνης σε σύντηξη με την ετικέτα His, παρέχει σε αυτήν την ικανότητα ισχυρής πρόσδεσης σε μεταλλικά ιόντα όπως το νικέλιο Ni<sup>+2</sup>. Έτσι, για την απομόνωση της FRA10AC1-His χρησιμοποιήθηκε αγαρόζη συζευγμένη με Ni-NTA (νίτριλο τριοξικό οξύ, nitrilotriacetic acid) σε μορφή σφαιριδίων (Qiagen, Cat No: 30210). Το NTA διαθέτει τέσσερις θέσεις πρόσδεσης για ιόντα νικελίου, με αποτέλεσμα τα σύμπλοκα Ni-NTA να προσδένονται πολύ ισχυρά σε ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που φέρουν την ετικέτα His. Το σύστημα επιτρέπει απομόνωση σε αποδιατακτικές και μη συνθήκες, καθώς η πρόσδεση δεν επηρεάζεται από την τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης ή του εξαπεπτιδίου των ιστιδινών. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- 1) Τα βακτήρια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε 10 ml διαλύματος λύσης των κυτταρικών μεμβρανών (8 M ουρία, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM ιμιδαζόλιο, 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη). Η ουρία και η β-μερκαπτοαιθανόλη είναι σχετικά ισχυροί αποδιατακτικοί παράγοντες. Ωστόσο, η χρήση τους στο συγκεκριμένο πείραμα κρίνεται κατάλληλη, καθώς σκοπός της απομόνωσης είναι ο καθαρισμός αντισώματος, ο οποίος δεν επηρεάζεται από την αποδιάταξη ή την κατάσταση ενεργότητας της πρωτεΐνης.
- 2) Το δείγμα επεξεργάστηκε με υπέρηχους με ειδική συσκευή (sonicator) για να πραγματοποιηθεί η θραύση των νουκλεϊκών οξέων και να μειωθεί το υψηλό ιξώδες που καθιστά αδύνατους τους χειρισμούς του δείγματος.
- 3) Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε (5 min, 1000 rpm) και συλλέχθηκε το υπερκείμενο.

- 4) Ακολούθησε επώαση με 200 μl σφαιριδίων Ni-NTA-αγαρόζης υπό ήπια ανάδευση για 3 h σε RT προκειμένου να επιτευχθεί η ειδική πρόσδεση της προς απομόνωση πρωτεΐνης στα σφαιρίδια. Η ικανότητα πρόσδεσης των σφαιριδίων είναι έως 50 mg πρωτεΐνης/ml ρητίνης και η επώαση έγινε σε περίσσεια σφαιριδίων.
- 5) Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 5 min στις 1000 rpm σε RT ώστε να καθιζάνουν τα συμπλέγματα σφαιριδίων-πρωτεΐνης.
- 6) Πραγματοποιήθηκαν τρεις πλύσεις με το διάλυμα λύσης κυτταρικών μεμβρανών για την απομάκρυνση μη ειδικά προσδεδμένων πρωτεϊνών.

### **2.5.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)**

Η ακρυλαμίδα σε συνδυασμό με την δις-ακρυλαμίδα έχει την ιδιότητα να πολυμερίζεται σε μορφή πηκτώματος, με μεγάλη αναλυτική ικανότητα τόσο για τις πρωτεΐνες όσο και τα νουκλεϊκά οξέα. Για τον πολυμερισμό είναι απαραίτητη η παρουσία καταλυτών, όπως του υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνης (tetramethylethylenediamine, TEMED). Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση πρωτεϊνών είναι αποδιατακτικά όταν η ανάλυση γίνεται βάσει μοριακού βάρους. Περιέχουν ένα ανιονικό απορρυπαντικό, το δωδεκυλο-θειϊκό νάτριο (sodium dodecyl sulfate, SDS) τόσο στο πήκτωμα όσο και στα διαλύματα ηλεκτροφόρησης και Laemmli. Το απορρυπαντικό αυτό έχει την ιδιότητα να προσδένεται από τα πολυεπεπίδια σε ποσότητα ανάλογη με το μέγεθός τους και να τα φορτίζει αρνητικά. Έτσι, παρουσία ηλεκτρικού πεδίου αυτά κινούνται προς την κάθοδο και διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους μέγεθος (για την ακρίβεια με βάση το λόγο μοριακό βάρος/ ηλεκτρικό φορτίο). Επίσης, το SDS αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, προκαλώντας τη διάσπαση των υδρογονικών δεσμών και των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Το πήκτωμα αποτελείται από δύο φάσεις διαφορετικής σύστασης, την ανώτερη και κατώτερη φάση. Στην ανώτερη φάση που ονομάζεται πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel), οι πρωτεΐνες ευθυγραμμίζονται αφού αποδιαταχθούν και ακολουθεί ο διαχωρισμός τους βάσει μεγέθους στην κατώτερη φάση που ονομάζεται πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel).

Οι ηλεκτροφορήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κάθετη συσκευή της Biorad, εφαρμόζοντας σταθερή ένταση πεδίου 35 mA. Χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 12 % (αναλυτικό και παρασκευαστικό), με πάχος

1,5 mm και διαστάσεις 8 x 7,3 cm. Στο αναλυτικό πήκτωμα χρησιμοποιήθηκε επίσης και πρωτεϊνικός μάρτυρας, ενώ στο παρασκευαστικό πήκτωμα στη θέση του μάρτυρα ηλεκτροφορήθηκε ένα μικρό ποσοστό του δείγματος για σύγκριση (βλ. 2.5.3.). Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- 1) Παρασκευάστηκε το πήκτωμα διαχωρισμού και προστέθηκε άμεσα στο εκμαγείο.
- 2) Προστέθηκε επαρκής ποσότητα ισοπρωπανόλης για να ευθυγραμμιστεί η επιφάνεια αυτού του πηκτώματος, όπου θα επιστοιβαχθεί η ανώτερη φάση, και αφήθηκε να πήξει για περίπου 20-30 min σε RT.
- 3) Απομακρύνθηκε η ισοπρωπανόλη και ξεπλύθηκε με απεσταγμένο νερό.
- 4) Παρασκευάστηκε το πήκτωμα επιστοιβάξης και προστέθηκε άμεσα στο εκμαγείο.
- 5) Τοποθετήθηκε άμεσα η ειδική χτένα για το σχηματισμό των πηγαδιών και το πήκτωμα αφήθηκε να πήξει για περίπου 20-30 min σε RT.
- 6) Το πήκτωμα τοποθετήθηκε στη συσκευή και προστέθηκε διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
- 7) Στα δείγματα προστέθηκε διάλυμα Laemmli, θερμάνθηκαν στους 100°C προκειμένου να αποδιαταχθούν πλήρως και αφού αφαιρέθηκε η χτένα, εισάχθηκαν στα πηγάδια του πηκτώματος.
- 8) Εφαρμόστηκε σταθερή ένταση πεδίου 35 mA.

#### ❖ Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

Μετά την ηλεκτροφόρηση αναλυτικού πηκτώματος SDS-PAGE, πραγματοποιήθηκε χρώση ως εξής:

- 1) Το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε διάλυμα Coomassie brilliant blue και επώαστηκε ολονύκτια υπό ήπια ανάδευση σε RT.
- 2) Το πήκτωμα ξεπλύθηκε με νερό και τοποθετήθηκε σε διάλυμα αποχρωματισμού.

Οι συστάσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

<b><u>Διάλυμα πηκτώματος επιστοιβάξης</u></b>	4,5% ακρυλαμίδη/δισακρυλαμίδη (29:1 v/v)
	0,125 M Tris-Cl pH 6,8
	0,1% SDS
	0,1% APS
	0,2% TEMED

<b><u>Διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού</u></b>	12% ακρυλαμίδη/δισακρυλαμίδη (29:1 v/v) 0,375 M Tris-Cl pH 8,8 0,1% SDS 0,1% APS 0,05% TEMED
--	---

<b><u>Διάλυμα Laemmli 5x</u></b>	250 mM Tris-Cl pH 6,8 <sup>1</sup> 10% SDS 50% γλυκερόλη 25% μερκαπτοαιθανόλη 0,5% bromophenol blue
----------------------------------	---

Η μερκαπτοαιθανόλη και το SDS συντελούν στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών, ενώ το Tris-Cl διατηρεί σταθερό το pH του διαλύματος. Η γλυκερόλη χρησιμοποιείται στο διάλυμα φόρτωσης προκειμένου να αυξήσει την πυκνότητα του δείγματος σε σχέση με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης, έτσι ώστε το δείγμα να βυθίζεται στο πηγάδι.

<b><u>Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10x</u></b>	250 mM Tris 1,92 M γλυκίνη 1% SDS pH 8,3 (ρύθμιση με HCl)
---	--

<b><u>Διάλυμα χρώσης</u></b>	45% v/v μεθανόλη 10% v/v οξικό οξύ 0,25% χρωστικής Coomasie Brilliant blue R250
------------------------------	--

<b><u>Διάλυμα αποχρωματισμού</u></b>	30% v/v μεθανόλη 10% v/v οξικό οξύ
--------------------------------------	---------------------------------------

<sup>1</sup> Χρησιμοποιήθηκε πυκνό διάλυμα 1,5 M Tris-Cl pH 6,8 και σκόνη SDS.

### 2.5.3. Υγρή ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη

Μετά την ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης FRA10AC1-His σε παρασκευαστικό πήκτωμα SDS-PAGE ακολούθησε η ηλεκτρομεταφορά της σε νιτροκυτταρίνη. Ακολούθησε η εξής διαδικασία:

- 1) Απομακρύνθηκε η ανώτερη φάση του πηκτώματος, ενώ από την κατώτερη φάση κόπηκε το κομμάτι με το δείγμα που φορτώθηκε για σύγκριση για να χρωματιστεί με Coomassie brilliant blue.
- 2) Μετρήθηκαν οι διαστάσεις του υπόλοιπου τμήματος του πηκτώματος και αυτό εμβαπτίστηκε αμέσως σε διάλυμα μεταφοράς.
- 3) Κόπηκαν 4 χαρτιά Wattman (3 mm) και ένα κομμάτι μεμβράνης PROTRAN (μέγεθος πόρων 0,2 μm) στις ίδιες διαστάσεις με αυτές του πηκτώματος.
- 4) Οι σπόγγοι και η μεμβράνη εμβαπτίστηκαν σε νερό, ενώ τα χαρτιά Wattman σε διάλυμα μεταφοράς. Η μη ύγρανση της μεμβράνης σε ορισμένα σημεία μπορεί να εμποδίσει την πρόσδεση της πρωτεΐνης σε αυτά.
- 5) Ακολούθησε η προετοιμασία της κασετίνας μεταφοράς στην οποία τοποθετήθηκαν με την εξής σειρά: ένας σπόγγος, 2 κομμάτια χαρτιού Wattman, το πήκτωμα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, 2 κομμάτια χαρτιού Wattman, ένας σπόγγος.
- 6) Η κασετίνα τοποθετήθηκε σε κάθετη συσκευή υγρής ηλεκτρομεταφοράς και προστέθηκε σε αυτήν διάλυμα μεταφοράς.
- 7) Η μεταφορά στη μεμβράνη έγινε ολονύκτια στους 4° C, εφαρμόζοντας σταθερή ένταση 110 mA.

Με το σύστημα υγρής ηλεκτρομεταφοράς μεταφέρεται η πρωτεΐνη από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Η κασετίνα τοποθετείται κάθετα στη δεξαμενή της συσκευής με φορά τέτοια, ώστε το πήκτωμα να βρίσκεται προς το θετικό πόλο της συσκευής, ενώ η μεμβράνη προς τον αρνητικό ενώ προστίθεται αρκετή ποσότητα διαλύματος μεταφοράς (transfer buffer), ώστε να διαποτίζεται το πήκτωμα και η μεμβράνη. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης διαθέτει υψηλή ικανότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών, χωρίς να εμποδίζει την ακόλουθη πρόσδεση αυτών σε αντισώματα. Επειδή συνήθως απαιτείται υψηλή ένταση ρεύματος, τοποθετείται πάγος σε κατάλληλη θέση της συσκευής, προκειμένου να μειωθεί η υψηλή θερμοκρασία που μπορεί να αναπτυχθεί και να προκαλέσει αλλοίωση του πηκτώματος (L. Buckingham, M. L. Flaws, 2007).

Η σύσταση του διαλύματος μεταφοράς είναι η ακόλουθη:

#### Διάλυμα μεταφοράς 10x

250 mM Tris  
1,92 M γλυκίνη  
1% SDS  
20% μεθανόλη

#### 2.5.4. Πρόσδεση και έκλουση αντισώματος

Η πρόσδεση του αντι-FRA10AC1 πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- 1) Το κομμάτι της μεμβράνης το οποίο περιελάμβανε μόνο την ανσυνδυασμένη πρωτεΐνη (βάσει της σύγκρισης με το δείγμα που είχε ηλεκτροφορηθεί παράλληλα και βάφτηκε με χρωστική) επωάστηκε με παρεμποδιστικό διάλυμα TBSM 1x για 1h σε RT.
- 2) Απομακρύνθηκε το παρεμποδιστικό διάλυμα και ακολούθησε ολονύκτια επώαση με τον ορό (3 ml) στους 4° C.
- 3) Ακολούθησαν 3 πλύσεις (επώαση για 10 min η καθεμία) με διάλυμα TBS 1x για να απομακρυνθεί η περίσσεια του ορού
- 4) Η έκλουση έγινε με διάλυμα γλυκίνης 0,2 M pH 1,9 (300 μl) και επώαση για 5 min.
- 5) Προστέθηκε άμεσα ίσος όγκος διαλύματος 1 M Tris-Cl pH 8 για εξισορρόπηση του pH.

Ακολούθησε ποσοτικοποίηση του αντισώματος με τη μέθοδο Bradford και έλεγχος της ποιότητάς του με ανάλυση Western.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν είναι η ακόλουθη:

#### Παρεμποδιστικό διάλυμα TBSM 1x

20 mM Tris-Cl pH 7,6  
137 mM NaCl  
5% άπαχο γάλα (σε σκόνη)

#### Διάλυμα πλύσης TBS 1x

20 mM Tris-Cl pH 7,6  
137 mM NaCl

#### 2.6. Ποσοτικοποίηση αντισώματος

Η ποσοτικοποίηση του καθαρισμένου αντισώματος αντι-FRA10AC1 έγινε βάσει της μεθόδου Bradford και χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της Bio-Rad Protein Assay. Πρόκειται για μια μέθοδο προσδιορισμού της συγκέντρωσης

διαλυτοποιημένης πρωτεΐνης με ακρίβεια. Περιλαμβάνει την προσθήκη όξινης χρωστικής σε πρωτεϊνικό διάλυμα και την επακόλουθη μέτρηση της οπτικής πυκνότητάς του (O. D.) σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 595 nm. Από την σύγκριση του αποτελέσματος της O.D. με μια πρότυπη καμπύλη O.D. και γνωστών συγκεντρώσεων της βοοειδούς αλβουμίνης του ορού (Bovine Serum Albumin, BSA) μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα για τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται στην Bio-Rad Protein Assay περιέχει χρωστική (Coomassie® Brilliant Blue G-250), φωσφορικό οξύ και μεθανόλη (Cat. No.: 500-0006). Η χρωστική προσδένεται σε βασικά και αρωματικά αμινοξέα, κυρίως στην αργινίνη, και προκαλεί αλλαγή χρώματος σε πρωτεϊνικά διαλύματα ανάλογα με την συγκέντρωσή τους. Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- 1) Παρασκευάστηκαν 5 διαφορετικές αραιώσεις αλβουμίνης αυξανόμενης συγκέντρωσης (3, 5, 7, 10, 14 µg/ml) σε τελικό όγκο 400 µl, ένα δείγμα καθαρισμένου αντισώματος αντι-FRA10AC1 (1 µl αντισώματος σε τελικό όγκο 400 µl) και ένα τυφλό δείγμα (400 µl ddH<sub>2</sub>O).
- 2) Προστέθηκαν σε όλα τα δείγματα 100 µl αντιδραστηρίου χρωστικής.
- 3) Τα δείγματα αναδεύτηκαν και επωάστηκαν για 5-10 min σε RT.
- 4) Ακολούθησε μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 595 nm.
- 5) Κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη οπτικής πυκνότητας και συγκεντρώσεων της αλβουμίνης και βάσει αυτής έγινε ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του αντισώματος.

## 2.7. Ανάλυση Western

Η ανάλυση Western χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση πρωτεϊνών. Η μέθοδος περιλαμβάνει τη μεταφορά πρωτεϊνικών δειγμάτων από ένα πήκτωμα ηλεκτροφόρησης σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή νάυλον, όπου οι πρωτεΐνες προσδένονται ισχυρά. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες μπορούν να αναλυθούν με τη χρήση ειδικών για αυτές αντισωμάτων. Η διαμόρφωση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επιτρέπει την αναγνώρισή τους από το ειδικό αντίσωμα (J. Lodge, P. Lund & S. Minchin, 2007). Συνήθως τα πρώτα αντισώματα-ανιχνευτές δεν είναι σημασμένα, αλλά η ανίχνευση γίνεται χρησιμοποιώντας ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο προσδένεται στη σταθερή περιοχή του πρώτου και το οποίο είναι συζευγμένο με ένζυμο ή φθορίζουσα ομάδα. Η προσέγγιση αυτή αυξάνει σημαντικά την ευαισθησία της μεθόδου (S. B. Primrose, R. M. Twyman & R. W. Old, 2001).

Η ανάλυση Western χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ποιότητας του καθαρισμένου αντισώματος αντι-FRA10AC1 και για τον έλεγχο της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης FRA10AC1-EGFP μετά από παροδική διαμόλυνση

κυττάρων *HeLa*. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Για την ανάλυση Western ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- 1) Η μεμβράνη επώαστηκε με παρεμποδιστικό διάλυμα TBSTM 1x για 1h σε RT υπό ανάδευση. Το διάλυμα αυτό εμποδίζει την πρόσδεση του αντισώματος στη μεμβράνη, μειώνει δηλαδή τις μη ειδικές συνδέσεις.
- 2) Απομακρύνθηκε το TBSTM και η μεμβράνη επώαστηκε ολονύκτια με το πρωτεύον αντίσωμα (υπό ανάδευση) στους 4° C και την κατάλληλη αραιώση.
- 3) Ακολούθησε η απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος με 3 διαδοχικές πλύσεις διάρκειας 10 min (υπό ανάδευση) η καθεμία με TBST 1x.
- 4) Η μεμβράνη επώαστηκε για 1h σε RT (υπό ανάδευση) με το δευτερεύον αντίσωμα σε αραιώση 1:15000 το οποίο είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση (horseradish peroxidase, HRP).
- 5) Πραγματοποιήθηκαν τρεις πλύσεις με TBST 1x (βλ. βήμα 3).
- 6) Ακολούθησε η ανίχνευση σήματος σε φιλμ με χημειοφωταύγεια (βλ. παρακάτω).

#### ❖ Ανίχνευση σήματος με χημειοφωταύγεια

Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για την οπτικοποίηση του σήματος. Στη μεμβράνη προστέθηκε επαρκής ποσότητα διαλύματος υποστρωμάτων της HRP ώστε να καλυφθεί (σε αναλογία όγκου 1:1, Pierce Cat. No.: 32106) και επώαστηκε για 5 min. Τα υποστρώματα αυτά έχουν την ιδιότητα να οξειδώνονται από την HRP και να παράγουν χημειοφωταύγεια, η οποία μπορεί να αποτυπωθεί σε φιλμ. Απομακρύνθηκαν τα υποστρώματα, οι μεμβράνες τυλίχθηκαν σε σελοφάν και ακολούθησε η έκθεση και η εμφάνισή τους σε φιλμ στο σκοτάδι. Μπορούν να πραγματοποιηθούν περισσότερες από μια εκθέσεις, η χρονική διάρκεια των οποίων μπορεί να παραταθεί έως 1 h, εάν δεν εμφανιστεί σήμα κατά την πρώτη έκθεση στο φιλμ. Για την εμφάνιση, το φιλμ εμβαπτίστηκε και αναδεύτηκε σε διάλυμα ανάπτυξης (Kodak) για 1 min, ακολούθως σε διάλυμα μονιμοποίησης (Kodak) για 1 min και τέλος ξεπλύθηκε σε νερό. Τα διαλύματα Kodak αραιώθηκαν με νερό σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Η χρονική διάρκεια επώασης στο διάλυμα ανάπτυξης μπορεί να ρυθμιστεί ανάλογα παρατηρώντας την εμφάνιση του σήματος σε σκοτεινό θάλαμο, χρησιμοποιώντας ειδικό κόκκινο φως.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν είναι η εξής:



### Παρεμποδιστικό διάλυμα TBSTM 1x

20 mM Tris-Cl pH 7,6  
137 mM NaCl  
0,1% Tween-20  
5% άπαχο γάλα σε σκόνη

### Διάλυμα πλύσης TBST 1x

20 mM Tris-Cl pH 7,6  
137 mM NaCl  
0,1% Tween-20

## 2.8. Καλλιέργεια κυττάρων *HeLa*

Η κυτταρική σειρά *HeLa* (στην οποία εκφράζεται η πρωτεΐνη FRA10AC1) χρησιμοποιήθηκε ως πηγή της πρωτεΐνης FRA10AC1 ώστε να ελεγχθεί το αντίσωμα αντι-FRA10AC1 καθώς και για τη μελέτη, σε επίπεδο μεταβολιτών, της επίδρασης της τροποποιημένης έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1*.

Τα κύτταρα *HeLa* αναπτύχθηκαν σε επωαστήρα στους 37°C, παρουσία 5% CO<sub>2</sub> και υγρασίας (στον επωαστήρα τοποθετείται σε ειδικό σκεύος αποστειρωμένο νερό το οποίο ανανεώνεται τακτικά). Η διατήρησή τους έγινε σε φλάσκες (T-75 ή T-25), όπου καθώς αναπτύσσονται σχηματίζουν μονοστοιβάδες. Οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε τρυβλία. Για την ανάπτυξη κυττάρων στην μικρότερη φλάσκα (T-25) χρησιμοποιήθηκαν περίπου 5-6 ml θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), ενώ στη μεγάλη φλάσκα 12-15 ml DMEM, ώστε να καλύπτεται κατάλληλα η επιφάνεια ανάπτυξης.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν έως ~80% βαθμού κάλυψης της επιφάνειας ανάπτυξης και επεξεργάστηκαν με τρυψίνη η οποία προκαλεί την αποκόλλησή τους από την επιφάνεια για να ακολουθήσει ανακαλλιέργεια (ή άλλοι πειραματικοί χειρισμοί). Ο προσδιορισμός του βαθμού κάλυψης έγινε με παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο. Για τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας ακολουθήθηκαν τα εξής στάδια:

- 1) Προθερμάνθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C τα εξής υλικά: θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με FBS (Fetal bovine serum), διάλυμα πλύσης 1x PBS, διάλυμα τρυψίνης σε 1xPBS.
- 2) Απομακρύνθηκε το θρεπτικό μέσο από τα κύτταρα και ακολούθησαν δύο πλύσεις με επαρκή ποσότητα διαλύματος 1xPBS.
- 3) Προστέθηκε διάλυμα τρυψίνης (~1 ml στη φλάσκα T-25 και ~3-4 ml στη φιάλη T-75) και τα κύτταρα επωάστηκαν ώσπου να αρχίσουν να αποκολλώνται από την επιφάνεια (3-5 min). Η τρυψίνη είναι μια πρωτεάση η οποία πρωτεολύει τις πρωτεΐνες σε ειδικές θέσεις, μετά από τη λυσίνη ή την αργινίνη και με

αυτόν τον τρόπο αποικοδομεί μόρια μέσω των οποίων τα κύτταρα προσκολλώνται στην επιφάνεια ανάπτυξης. Πραγματοποιήθηκε έντονη ανάδευση (μηχανικά με χτύπημα της φλάσκας με το χέρι) προκειμένου να μην υπάρχουν συσσωματώματα κυττάρων (έλεγχος στο μικροσκόπιο).

- 4) Προστέθηκε θρεπτικό μέσο DMEM (~5 ml για φλάσκα T-25 και ~10 ml για φλάσκα T-75) και ακολούθησε πιπετάρισμα για τη διάλυση τυχόν κυτταρικών συσσωματωμάτων που έχουν απομείνει. Με την προσθήκη του θρεπτικού μέσου, στο οποίο υπάρχει ορός, η τρυψίνη αποικοδομεί τις πρωτεΐνες του ορού και έτσι αναστέλλεται η δράση της στα κύτταρα.
- 5) Στη φλάσκα παρέμεινε ~1/6 των επαναιωρημένων κυττάρων (~15% κάλυψη) και έγινε συμπλήρωση του όγκου με DMEM.
- 6) Η φλάσκα τοποθετήθηκε άμεσα στον επωαστήρα αφήνοντας λίγο ανοικτό το καπάκι ώστε να είναι δυνατή η είσοδος CO<sub>2</sub>. Συνήθως, η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται κάθε 3-4 μέρες.

## 2.9. Κρυοδιατήρηση κυττάρων *HeLa* και επανακαλλιέργεια

Η διατήρηση των κυττάρων σε υγρό άζωτο για μεγάλο χρονικό διάστημα είναι δυνατή με τη χρήση ενός κρυοπροστατευτικού παράγοντα. Η συλλογή των κυττάρων για να καταψυχθούν σε υγρό άζωτο έγινε κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης (~80% βαθμός κάλυψης της επιφάνειας ανάπτυξης).

Η διαδικασία για την κατάψυξη κυττάρων από φλάσκα T-75 είχε ως εξής:

- 1) Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 1x PBS.
- 2) Αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια ανάπτυξης με τρυψίνη (βλ. 2.8.).
- 3) Συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (8 min, 1000 rpm, RT).
- 4) Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 1,5 ml DMEM.
- 5) Προστέθηκε σταγόνα-σταγόνα (υπό συνεχή ανακίνηση) ίσος όγκος διαλύματος DMEM με 20% DMSO (dimethylsulfoxide, Sigma), ώστε η τελική συγκέντρωση του DMSO να είναι 10%. Το DMSO, το οποίο χρησιμοποιείται ως κρυοπροστατευτικό μέσο, όταν προστίθεται στα κύτταρα προκαλεί αύξηση θερμοκρασίας. Έτσι προστίθεται σταγόνα-σταγόνα προκειμένου η αύξηση αυτή να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη, ενώ παράλληλα αποτρέπεται το ωσμωτικό σοκ των κυττάρων.
- 6) Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε κατάλληλα φιαλίδια (cryovials) τα οποία τυλίχθηκαν με χαρτί (χρησιμοποιήθηκε ως μονωτικό υλικό) και

τοποθετήθηκαν για περίπου 1h στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , όπου παρέμειναν ολονύκτια.

- 7) Αποθηκεύτηκαν σε δεξαμενή υγρού αζώτου ( $-196^{\circ}\text{C}$  ως  $-156^{\circ}\text{C}$ ), όπου μπορούν να διατηρηθούν επ' αόριστον. Η σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας πραγματοποιείται για να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό του κυττάρου.

Η επανακαλλιέργεια κυττάρων που έχουν αποθηκευτεί σε υγρό άζωτο πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- 1) Το δείγμα μεταφέρθηκε κατευθείαν σε υδατόλουτρο στους  $37^{\circ}\text{C}$  όπου ανακινήθηκε ήπια για 1-2 min προκειμένου να τηχθεί το θρεπτικό μέσο.
- 2) Το δείγμα μεταφέρθηκε σε φλάσκα που περιέχει DMEM.
- 3) Ακολούθησε η καλλιέργεια των κυττάρων στον επωαστήρα.

## 2.10. Μέτρηση αριθμού κυττάρων

Γενικά, η μέτρηση του αριθμού κυττάρων είναι πολλές φορές απαραίτητη σε πειραματικές μελέτες. Σε αυτήν την εργασία χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί ο απαιτούμενος αριθμός κυττάρων ανά δείγμα για ανίχνευση μεταβολιτών με χρωματογραφία αερίων-φασματοσκοπία μαζών. Για τη μέτρηση των κυττάρων *HeLa* χρησιμοποιήθηκε αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer), η χρήση του οποίου αποτελεί την πιο άμεση, απλή και οικονομική μέθοδο για τη μέτρηση κυττάρων.

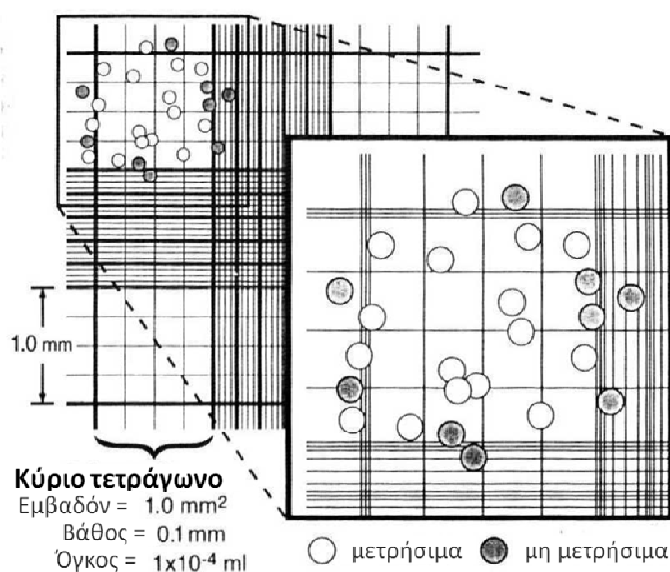
Το αιμοκυτταρόμετρο (Εικ. 2.3.) είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα με δύο λείες επιφάνειες, καθεμία από τις οποίες διαθέτει διαγράμμιση σε μορφή τετραγωνισμένου πλέγματος, το οποίο αποτελείται από εννέα κύρια τετράγωνα με εμβαδόν  $1\text{ mm}^2$  (δηλ. μήκος πλευράς  $1\text{ mm}$ ). Κάθε τετράγωνο ορίζεται από τρεις παράλληλες ισαπέχουσες γραμμές (απέχουν  $2,5\text{ }\mu\text{m}$ ), με βάση τις οποίες καθορίζεται εάν τα κύτταρα βρίσκονται εντός ή εκτός του τετραγώνου. Κάθε τετράγωνο διαιρείται σε δεκαέξι μικρότερα τετράγωνα, ώστε να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Το διαβαθμισμένο πλέγμα με τα κύρια τετράγωνα βρίσκεται  $0,1\text{ mm}$  χαμηλότερα από δύο παράλληλες προεξοχές, τις «ράχες» του αιμοκυτταρόμετρου, στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Ανάμεσα στην εξωτερική πλευρά της λείας τετραγωνισμένης επιφάνειας και στις «ράχες» όπου στηρίζεται η καλυπτρίδα υπάρχει μια αυλάκωση, στην οποία εισάγεται το κυτταρικό εναιώρημα και απλώνεται με τριχοειδείς δυνάμεις στη διαβαθμισμένη επιφάνεια του αιμοκυτταρόμετρου. Επειδή ο όγκος που καταλαμβάνει το κυτταρικό εναιώρημα σε

καθένα από τα εννέα τετράγωνα είναι  $1 \text{ mm}^3$  ή  $1 \times 10^{-4}$ , ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων γίνεται ως εξής:

$$\text{Αριθμός κυττάρων/ ml} = \text{μέσος αριθμός κυττάρων ανά τετράγωνο} \times 1 \times 10^4$$

Για τη μέτρηση ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- 1) Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 1x PBS, επεξεργάστηκαν με τρυψίνη, συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (8 min, 1000 rpm, RT) και επαναιωρήθηκαν σε 10ml DMEM.
- 2) Από το εναιώρημα αυτό λήφθηκαν 10 μl και τοποθετήθηκαν στην ειδική αυλάκωση του αιμοκυτταρόμετρου.
- 3) Ακολούθησε η μέτρηση των κυττάρων με παρατήρηση στο μικροσκόπιο και ο υπολογισμός του αριθμού τους στο εναιώρημα.
- 4) Ανάλογα με τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων προς ανάπτυξη στο τρυβλίο, υπολογίστηκε και μεταφέρθηκε η κατάλληλη ποσότητα εναιωρήματος σε αυτό.



**Εικόνα 2.3.:** Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer). Στην εικόνα φαίνεται ο τρόπος μέτρησης των κυττάρων σε ένα από τα εννέα κύρια τετράγωνα ([www.cardiff.ac.uk](http://www.cardiff.ac.uk)).

## 2.11. Συλλογή κυττάρων *HeLa* για μέτρηση μεταβολιτών

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν 48 h μετά τη διαμόλυνση προκειμένου να πραγματοποιηθεί μεταβολομική μέτρηση. Για τη συλλογή τους χρησιμοποιήθηκε ισοτονικό διάλυμα (PBS ή TBS) που συντελεί στη διατήρηση του σταθερού pH των κυττάρων. Συλλέχθηκαν κύτταρα *HeLa* παροδικά διαμολυσμένα και μη ως εξής:

- 1) Τα τρυβλία με τα κύτταρα και το διάλυμα πλύσης τοποθετήθηκαν και παρέμειναν στον πάγο καθ' όλη τη διάρκεια της συλλογής. Αυτό εφαρμόστηκε για την αναστολή των λειτουργιών του κυτταρικού μεταβολισμού.
- 2) Αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με 5 ml παγωμένου διαλύματος πλύσης 1x PBS ή 1x TBS.
- 3) Προστέθηκαν 5 ml διαλύματος πλύσης 1x PBS ή 1x TBS και ακολούθησε η αποκόλληση των κυττάρων με τη χρήση ειδικής ξύστρας (scraper).
- 4) Το εναιώρημα των κυττάρων συλλέχθηκε σε falcon (15ml) και φυγοκεντρήθηκε (5 min, 1000rpm, 4°C).
- 5) Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε περίπου 0,5 ml διαλύματος πλύσης και μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια eppendorf (1,5 ml), όπου και φυγοκεντρήθηκαν στις ίδιες συνθήκες.
- 5) Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και τα κύτταρα φυλάχθηκαν στους -80°C μέχρι να σταλούν σε ξηρό πάγο για μεταβολομική μέτρηση.

Η σύσταση του διαλύματος 1x TBS είναι η ακόλουθη:

<b><u>Διάλυμα 1x TBS</u></b>	50 mM Tris
	150 mM NaCl
	Ρύθμιση του pH στο 7,6 με HCl

## 2.12. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων *HeLa* με συγκατακρήμνιση του DNA με $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην συγκατακρήμνιση του DNA με  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Ειδικότερα, το DNA σχηματίζει σύμπλοκα με τα μόρια του  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  σε μορφή ιζήματος και προσλαμβάνεται από τα κύτταρα με ενδοκύτωση. Ορισμένα σύμπλοκα DNA- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  διαφεύγουν από τα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα και εισέρχονται στον πυρήνα, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η παροδική έκφραση του εξωγενούς γονιδίου σε ποσοστό κυττάρων *HeLa* που κυμαίνεται συνήθως από 5-20%. Ο βαθμός απόδοσης εξαρτάται από την καλή ποιότητα του DNA και των κυττάρων, τα

οποία πρέπει να βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης (Sambrook & Russell, 2001).

Πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με την πλασμιδιακή κατασκευή FRA\_full\_pEGFP\_N1 (Σαραφίδου Θ., Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 2005) (βλ. 2.3.), με σκοπό την παροδική υπερέκφραση του γονιδίου *FRA10AC1*. Για τη διαμόλυνση σε τρυβλία διαμέτρου 10 cm ακολουθήθηκαν τα εξής στάδια:

- 1) Αφού πραγματοποιήθηκε μέτρηση με αιμοκυτταρόμετρο, σε κάθε τρυβλίο επιστρώθηκαν  $2 \times 10^6$  κύτταρα και ακολούθησε η ανάπτυξή τους μέχρι να καλύψουν περίπου το 50% της επιφάνειας.
- 2) Το θρεπτικό μέσο (9 ml) ανανεώθηκε 1-2 h πριν τη διαμόλυνση.
- 3) Το DNA (πλασμιδιακή κατασκευή, 20 μg) ρυθμίστηκε σε τελικό όγκο 450 μl με  $H_2O$  και σε αυτό προστέθηκαν 50 μl  $CaCl_2$  σε τελική συγκέντρωση  $250 \text{ mM}^2$ . Ακολούθησε πολύ καλή ανάμειξη.
- 4) Προστέθηκαν σταδιακά 500 μl διαλύματος HEBS 2x (280 mM NaCl, 50 mM Hepes, 5 mM  $Na_2HPO_4$ ), ενώ ταυτόχρονα το διάλυμα ανακινούνταν.
- 5) Το τελικό διάλυμα επώαστηκε σε RT για ~15 min, ώστε να σχηματιστεί ίζημα σε μορφή λεπτόκοκκων κρυστάλλων  $Ca_3(PO_4)_2$ -DNA. Ο σχηματισμός μεγάλων κρυστάλλων δεν είναι επιθυμητός γιατί δεν μπορούν να προσληφθούν εύκολα από τα κύτταρα. Έτσι, κατά τη διάρκεια της επώασης, εάν παρατηρηθεί ότι αρχίζει σχηματισμός μεγάλων κρυστάλλων, αυτοί απομακρύνονται και το διάλυμα προστίθεται στα κύτταρα πριν την παρέλευση των 15 min.
- 6) Το διάλυμα προστέθηκε σταγόνα-σταγόνα στα κύτταρα.
- 7) Μετά από 12 ώρες επώασης πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις με 1x PBS και προστέθηκε φρέσκο θρεπτικό μέσο (9 ml).
- 8) Ακολούθησε η συλλογή των κυττάρων ύστερα από 48h.

Η σύσταση του διαλύματος HEBS 2x είναι η ακόλουθη:

**Διάλυμα HEBS 2x (pH 7,12)**

280 mM NaCl  
50 mM Hepes  
5 mM  $Na_2HPO_4$

---

<sup>2</sup> Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα  $CaCl_2$  συγκέντρωσης 2,5 M.

### **2.13. Μονιμοποίηση κυττάρων σε καλυπτρίδα και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού**

Στα διαμολυσμένα κύτταρα η πρωτεΐνη FRA10AC1 εκφράζεται σε σύντηξη με την φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP και μπορεί να παρατηρηθεί άμεσα σε μικροσκόπιο φθορισμού, επιτρέποντας την εκτίμηση του ποσοστού των διαμολυσμένων κυττάρων. Για τον σκοπό αυτό, κατά την ανάπτυξη των κυττάρων που επρόκειτο να διαμολυνθούν είτε με την πλασμιδιακή κατασκευή *FRA\_full\_pEGFP\_N1* είτε με το φορέα pEGFP (control), τοποθετήθηκαν στα αντίστοιχα τρυβλία καλυπτρίδες. Για την προετοιμασία των καλυπτρίδων για παρατήρηση στο μικροσκόπιο ακολουθήθηκαν τα εξής στάδια:

- 1) Πριν την απόξεση και συλλογή των κυττάρων, η καλυπτρίδα τοποθετήθηκε σε τρυβλίο διαμέτρου 3 cm και πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις με διάλυμα 1x PBS.
- 2) Απομακρύνθηκε αυτό το διάλυμα και προστέθηκε στην καλυπτρίδα διάλυμα φορμαλδεΰδης 4%, το οποίο μονιμοποιεί τα κύτταρα στην επιφάνεια της καλυπτρίδας.
- 3) Ακολούθησε άλλη μια πλύση με 1x PBS.
- 4) Σε αντικειμενοφόρο πλάκα προστέθηκε επαρκής ποσότητα υλικού mounting (DPX mountant for microscopy, BDH Laboratory Supplies England). Το υλικό αυτό χρησιμοποιείται για να εμποδίσει τη γρήγορη απώλεια εκπομπής φθορισμού κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο, η οποία οφείλεται στην παραγωγή ελεύθερων ριζών κατά τη διέγερση του δείγματος από την πηγή του φωτός.
- 5) Η καλυπτρίδα τοποθετήθηκε στην αντικειμενοφόρο πλάκα με την πλευρά στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα προς τα κάτω και χρησιμοποιήθηκε βερνίκι για στεγανοποίηση του δείγματος.
- 6) Η αντικειμενοφόρος φυλάχθηκε στους -20°C, όπου μπορεί να μείνει για αρκετό καιρό μέχρι να γίνει η παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο φθορισμού.

### **2.14. Μεταβολομική ανάλυση με χρωματογραφία αερίων-φασματομετρία μάζας (GC- MS)**

Αυτή η μέθοδος έπαιξε κρίσιμο ρόλο κατά την πρώιμη ανάπτυξη της μεταβολομικής και, καθώς μετρά αρκετά χρόνια εφαρμογής, αποτελεί πλέον μια πολύ καλά ανεπτυγμένη μέθοδο. Χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και

χρωματογραφική ανάλυση, καθώς και από την ικανότητα ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης πολλών κατηγοριών μεταβολιτών. Σε αυτές περιλαμβάνονται αμινοξέα, οργανικά και λιπαρά οξέα, μερικά λιπίδια, σάκχαρα, φωσφορικά οξέα, αμίνες, αμίδια και άλλα. Ωστόσο, η ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών είναι σχετικά μέτρια (Quinones, 2009). Η μέθοδος είναι ιδανική για την ανάλυση πτητικών μη πολικών μεταβολιτών και έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές τέτοιου είδους μελέτες (Dixon S. J. et al., 2007, Farag M. A., 2006, Lui L. H., 2005). Ωστόσο, ο βαθμός πτητικότητας που απαιτείται ώστε να είναι δυνατή η ανάλυση των μεταβολιτών αποτελεί περιορισμό της μεθόδου. Για να εφαρμοστεί σε πολικά μόρια πρέπει προηγουμένως να σχηματίσουν παράγωγα με μεγαλύτερη πτητικότητα και χαμηλότερη πολικότητα, τα οποία μπορούν στη συνέχεια να αναλυθούν.

Τα κύτταρα για τη μεταβολομική ανάλυση μετά τη συλλογή τους διατηρήθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι να σταλούν σε ξηρό πάγο στο Εργαστήριο Μεταβολικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας του ΙΤΕ/ΕΙΧΗΜΥΘ (Δρ. Κλάπα Μαρία), όπου πραγματοποιήθηκε η ανάλυση του προτύπου των ελεύθερων μικρών πολικών μεταβολιτών, με τη χρήση χρωματογραφίας αερίων-φασματομετρίας μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy, GC-MS). Τα πρότυπα των πολικών μεταβολιτών στα δείγματα μετρήθηκαν ακολουθώντας το πειραματικό πρωτόκολλο των Chrysanthopoulos *et al* (2009), που αναφέρεται σε νεφρικά κύτταρα χάμστερ. Η παραγωγή του μείγματος των ελεύθερων μεταβολιτών που απομονώνονται από τα κύτταρα είναι απαραίτητη στην μεταβολομική με GC-MS, ώστε να καταστούν οι μεταβολίτες πτητικοί και θερμικά σταθεροί στις υψηλές θερμοκρασίες της χρωματογραφικής στήλης. Τα δείγματα επεξεργάστηκαν μηχανικά με έμβολο και οργανικό διαλύτη (μεθανόλη). Ως διαλύτες παραγωγής χρησιμοποιήθηκαν οι MeOH και MSTFA.



### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

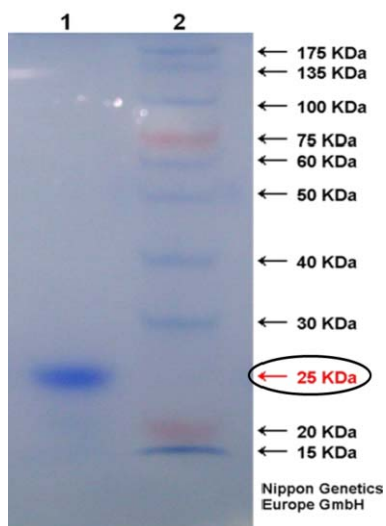
### 3. 1. Καθαρισμός αντισώματος α-FRA10AC1

#### 3. 1. 1. Παραγωγή και απομόνωση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε βακτήρια

Σκοπός της εργασίας είναι η βελτιστοποίηση της μεθόδου χειρισμού κυττάρων *HeLa*, ώστε μελλοντικά να μελετηθεί η επίδραση της υπερέκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1* σε μεταβολομικό επίπεδο σε κύτταρα *HeLa*. Ο έλεγχος των επιπέδων υπερέκφρασης της πρωτεΐνης *FRA10AC1* με ανάλυση Western είναι δυνατός με τη χρήση ενός ειδικού αντισώματος έναντι αυτής. Επειδή υπήρχε διαθέσιμος πολυκλωνικός ορός α-FRA10AC1, ο οποίος περιέχει εκτός των άλλων αντίσωμα έναντι της *FRA10AC1* αλλά και της ετικέτας GST [χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη *FRA10AC1*-GST για την ανοσοποίηση του ζώου (Αποστολοπούλου Δ., Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης 2003)], για να απομονωθεί το αντίσωμα α-FRA10AC1 από αυτόν, χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη *FRA10AC1* σε σύντηξη με μια άλλη ετικέτα, την ετικέτα His .

Για την παραγωγή της πρωτεΐνης *FRA10AC1*-His, μετασχηματίστηκαν βακτήρια *E.coli* [στέλεχος BL21 (DE3) CodonPlus] με πλασμιδιακή κατασκευή σε φορέα pET-26b(+), στον οποίο είναι εντεθειμένη η αλληλουχία που αντιστοιχεί στα 145 αμινοτελικά αμινοξέα της πρωτεΐνης *FRA10AC1*. Πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης σε υγρή καλλιέργεια των κυττάρων και απομόνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από αυτά. Ακολούθησε χρωματογραφία συγγένειας με υπόστρωμα σεφαρόζης Ni-NTA για να απομονωθεί η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη.

Ο έλεγχος της επαγωγής έγινε με ηλεκτροφόρηση περίπου του 3% του συνολικού δείγματος (συζευγμένου με τα σφαιρίδια σεφαρόζης) σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS- PAGE) και χρώση του πηκτώματος με Coomassie Blue. Το αναμενόμενο μέγεθος της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης [όπως υπολογίστηκε με την εφαρμογή υπολογιστικών μεθόδων, Expsy tool (Compute pI/MW), [http://web.expsy.org/compute\\_pi/](http://web.expsy.org/compute_pi/) ] είναι περίπου 25 kDa, σε συμφωνία με το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 3.1).



**Εικόνα 3.1.:** Παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης FRA10AC1<sub>1-145αα</sub>-His σε βακτήρια. 1) Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, συγκριτικά με το μάρτυρα, έχει μέγεθος περίπου 25 kDa, σε συμφωνία με το εκτιμώμενο μέγεθος. 2) Πρωτεϊνικός μάρτυρας (Blue/Orange Protein Marker/ Nippon Genetics Europe GmbH, Cat. No.: MWP01).

### 3. 1. 2. Πρόσδεση, έκλουση και ποσοτικοποίηση αντισώματος

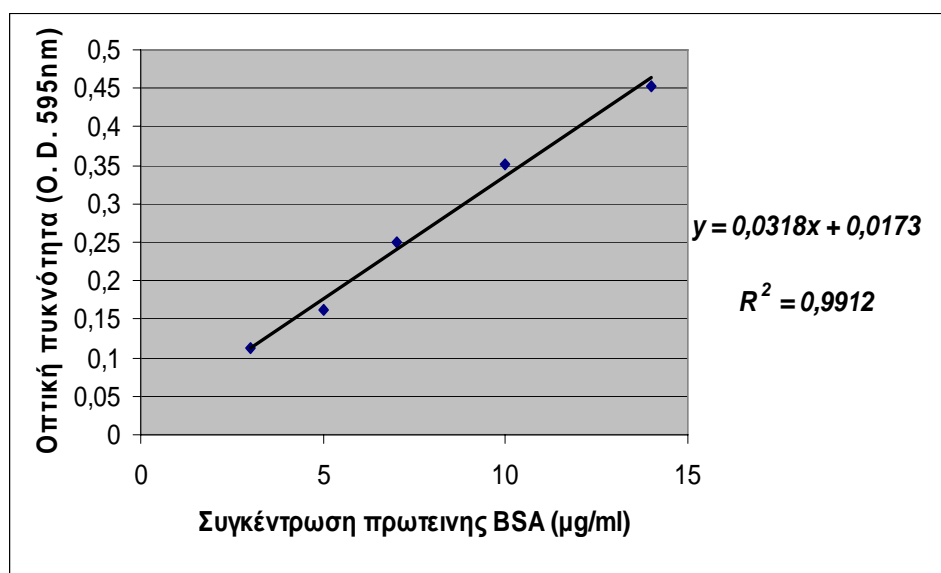
Όλη η υπόλοιπη ποσότητα της απομονωθείσας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορήθηκε σε παρασκευαστικό αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και μεταφέρθηκε σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με υγρή ηλεκτρομεταφορά. Το τμήμα της μεμβράνης που περιλάμβανε την πρωτεΐνη επώαστηκε με πολυκλωνικό ορό α-FRA10AC1 (3 ml), απομακρύνθηκαν τα μη δεσμευμένα μακρομόρια και τέλος, πραγματοποιήθηκε έκλουση του αντισώματος α-FRA10AC1 (5 min).

Η ποσοτικοποίηση του καθαρισμένου αντισώματος έγινε με τη μέθοδο Bradford. Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα πέντε διαφορετικών συγκεντρώσεων της βοοειδούς αλβουμίνης του ορού (Bovine Serum Albumin, BSA), των οποίων η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 595nm (βλ. Πίνακας 3.1).

Από τα παραπάνω δεδομένα σχεδιάστηκε η πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης πρωτεΐνης και οπτικής πυκνότητας (O. D.) (Διάγραμμα 1), βάσει της οποίας η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος υπολογίζεται σε 3,1352 μg/ml. Όμως, επειδή το δείγμα του αντισώματος που μετρήθηκε περιείχε 4 ml αντισώματος σε τελικό όγκο 400μl διαλύματος, η συγκέντρωση του καθαρισμένου αντισώματος είναι ~310 ng/μl. Ο συνολικός όγκος του αντισώματος που καθαρίστηκε από 3 ml πολυκλωνικού ορού είναι 600 ml και λαμβάνοντας υπόψη τη συγκέντρωση του αντισώματος, η συνολική ποσότητά του είναι αρκετά ικανοποιητική (186 μg).

**Πίνακας 3.1:** Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων της BSA και οι αντίστοιχες τιμές οπτικής πυκνότητας που χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης, καθώς και η οπτική πυκνότητα του διαλύματος του αντισώματος  $\alpha$ -FRA10AC1.

Συγκέντρωση BSA ( $\mu\text{g/ml}$ )	Οπτική πυκνότητα (O. D.) <sub>595nm</sub>
3 $\mu\text{g/ml}$	0,113
5 $\mu\text{g/ml}$	0,162
7 $\mu\text{g/ml}$	0,249
10 $\mu\text{g/ml}$	0,352
14 $\mu\text{g/ml}$	0,452
$C_{Ab} = ?$	0,117



**Διάγραμμα 1 :** Η καμπύλη περιγράφει τη σχέση μεταξύ της οπτικής πυκνότητας ενός διαλύματος BSA και της συγκέντρωσής της στο διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη καμπύλη για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του καθαρισμένου αντισώματος  $\alpha$ -FRA10AC1.

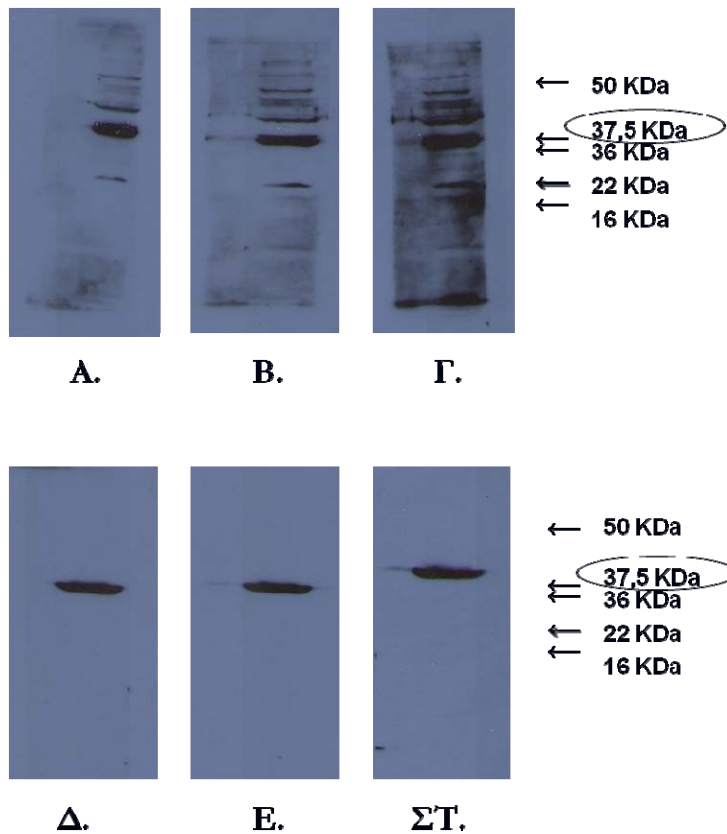
### 3. 2. Έλεγχος ποιότητας αντισώματος με ανάλυση Western

Η ποιότητα του καθαρισμένου αντισώματος  $\alpha$ -FRA10AC1 ελέγχθηκε με ανάλυση Western σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων *HeLa*, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε επόμενα πειράματα ελέγχου της υπερέκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1* σε αυτά τα κύτταρα. Η επιλογή των κυττάρων *HeLa* βασίστηκε στο ότι είναι γνωστό ότι

εκφράζεται η πρωτεΐνη FRA10AC1 (Sarafidou *et al*, υπό συγγραφή). Επίσης επειδή είναι κυτταρική σειρά εύκολη στο χειρισμό, στην οποία εύκολα γίνεται διαμόλυνση, ήταν η προκαταρκτική επιλογή για μελέτη μεταβολομικού προτύπου μετά την υπερέκφραση. Λόγω των πειραματικών αυτών έχει σχεδιαστεί σε επόμενα πειράματα να χρησιμοποιηθούν κύτταρα *HeLa* για τη δημιουργία σταθερά τροποποιημένων κυττάρων, στις οποίες θα υπερεκφράζεται η FRA10AC1 υπό τον έλεγχο ενός επαγωγίμου υποκινητή.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε συνολικά περίπου 1 mg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος κυττάρων (από 1 τρυβλίο με σχεδόν πλήρη κάλυψη). Για να ελεγχθούν διαφορετικές συγκεντρώσεις του αντισώματος και για να γίνει σύγκριση ως προς τον ορό, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση 6 δειγμάτων (περίπου 170 μg το καθένα) σε SDS-PAGE 12%. Μετά την ηλεκτρομεταφορά, η μεμβράνη κόπηκε σε 6 τμήματα (κάθε τμήμα αντιστοιχούσε σε ένα δείγμα) τα οποία επώαστηκαν ολονύκτια στους 4°C με 3 διαφορετικές αραιώσεις του καθαρισμένου αντισώματος α-FRA10AC1 (1/100, 1/300, 1/500) και 3 διαφορετικές αραιώσεις πολυκλωνικού ορού (1/300, 1/600, 1/1000). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πλύσεις των μεμβρανών, επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα και εμφάνιση του σήματος.

Με βάση τα αποτελέσματα, το καθαρισμένο αντίσωμα είναι ειδικό καθώς αναγνώρισε μόνο μία ζώνη στο αναμενόμενο μέγεθος (37,5 kDa), σε συμφωνία με το μέγεθος της FRA10AC1 (Εικ. 3.2 Δ, Ε, ΣΤ). Το σήμα είναι εξίσου ικανοποιητικό και στις τρεις αραιώσεις, επομένως στα επόμενα πειράματα για λόγους οικονομίας επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η μεγαλύτερη αραιώση (1/500). Η επώαση με ακαθάριστο πολυκλωνικό ορό εκτός από το σήμα σε μέγεθος 37,5 kDa, έδωσε πολλαπλά σήματα που δείχνει ότι ο ορός περιέχει αντισώματα έναντι και άλλων πρωτεϊνών (Εικ. Α, Β, Γ), οι οποίες προφανώς υπάρχουν στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων *HeLa*.



**Εικόνα 3.2:** Έλεγχος ποιότητας αντισώματος  $\alpha$ -FRA10AC1. Ανάλυση Western με ακαθάριστο πολυκλωνικό ορό σε αραιώσεις 1/300 (Α), 1/600 (Β) και 1/1000 (Γ) και με καθαρισμένο  $\alpha$ -FRA10AC1 σε αραιώσεις 1/100 (Δ), 1/300 (Ε) και 1/500 (ΣΤ) (διάρκεια έκθεσης: 2 min).

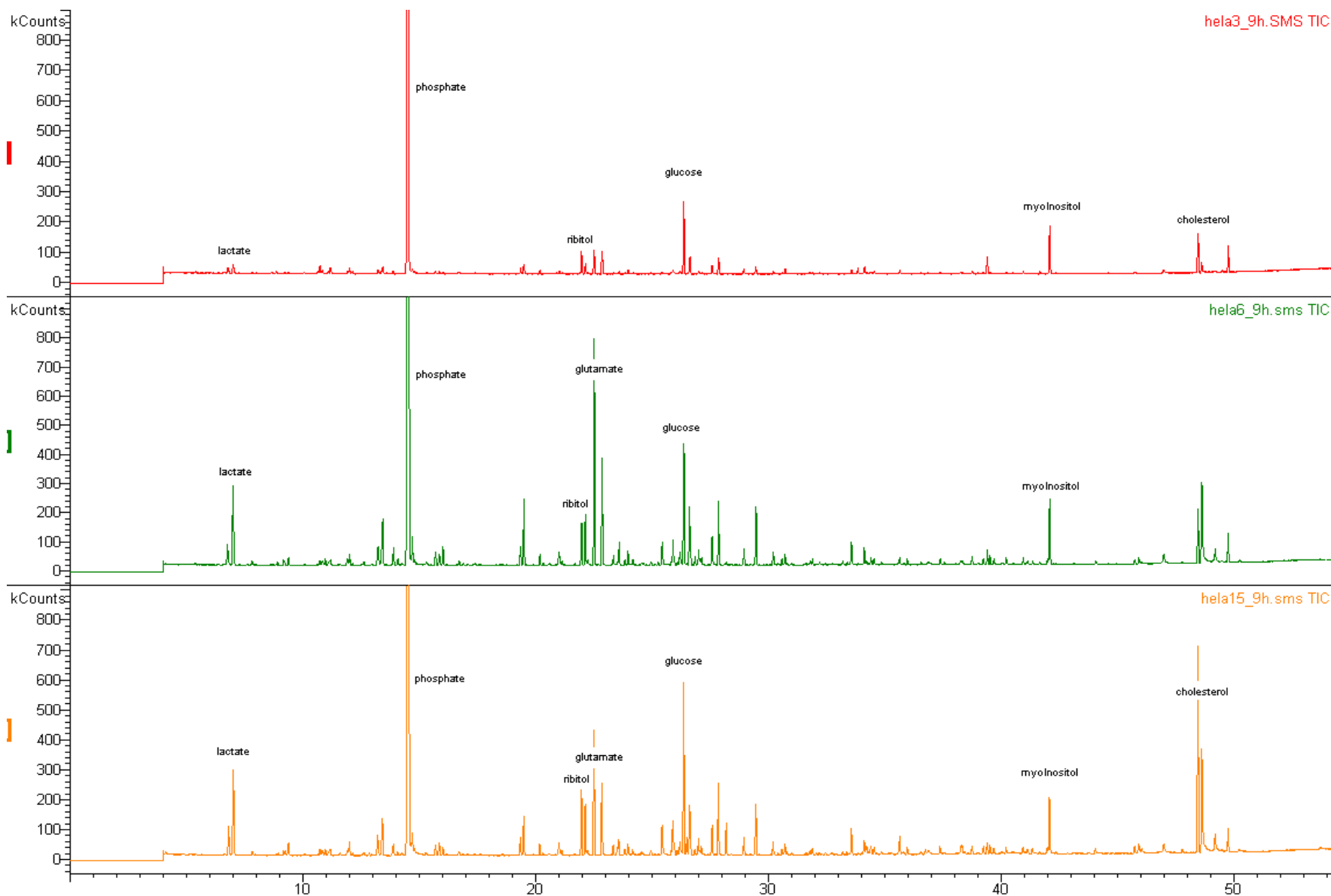
### 3.3. Βελτιστοποίηση μεθόδου συλλογής κυττάρων *HeLa* για ανίχνευση μεταβολιτών με χρωματογραφία αερίων-φασματομετρία μάζας. Έλεγχος αριθμού κυττάρων

Σκοπός είναι η βελτιστοποίηση της μεθόδου συλλογής κυττάρων *HeLa* για ανίχνευση μεταβολιτών με χρωματογραφία αερίων-φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy, GC-MS) ως προς τον απαιτούμενο αριθμό κυττάρων ανά δείγμα, ώστε να είναι ανιχνεύσιμοι οι μεταβολίτες. Η βελτιστοποίηση της μεθόδου ήταν αναγκαία, καθώς δεν έχει πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής μεταβολομική ανάλυση σε κύτταρα ανθρώπου.

Με σκοπό τον προσδιορισμό του ελάχιστου αλλά ταυτόχρονα και ικανού αριθμού κυττάρων ώστε να είναι προσδιορίσιμο το μεταβολικό πρότυπο με μεγάλη διακριτική ικανότητα, συλλέχθηκαν κύτταρα από 1, 2 και 5 τρυβλία (10 cm) με 100% κάλυψη αντίστοιχα, σε καθένα από το οποίο είχαν αναπτυχθεί περίπου  $10^6$  κύτταρα (δηλ. συνολικά 3 δείγματα με περίπου  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  και  $5 \times 10^6$  κύτταρα, αντίστοιχα). Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε πελέττες με διάλυμα πλύσης 1xPBS, 48h μετά από την

επίστρωσή τους στα τρυβλία, πραγματοποιώντας όλους τους χειρισμούς στον πάγο. Κατόπιν, αποθηκεύτηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  και στάλθηκαν σε ξηρό πάγο για μέτρηση στο Εργαστήριο Μεταβολικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας του ΙΤΕ/ΕΙΧΗΜΥΘ (Δρ. Κλάπα Μαρία). Τα μεταβολικά πρότυπα των τριών δειγμάτων προσδιορίστηκαν με GC-MS (Εικόνα 3.3). Στο χρωματογράφημα, κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε διαφορετικό μεταβολίτη, ενώ το ύψος (ή εμβαδόν) της κορυφής είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του μεταβολίτη. Στο χρωματογράφημα, ο άξονας x αναπαριστά το χρόνο παραμονής του μεταβολίτη στη στήλη χρωματογραφίας (retention time). Επειδή από τη στήλη εξάγονται πρώτα τα μόρια μικρότερου μοριακού βάρους και ακολουθούν αυτά με μεγαλύτερο μοριακό βάρος, στην αριστερή πλευρά του άξονα εμφανίζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στα μικρά και γραμμικά μόρια, ενώ στα αριστερά εμφανίζονται τα μεγάλα και αρωματικά. Εκτός από την επαναληψιμότητα του προτύπου στα τρία δείγματα, φαίνεται ότι ο αριθμός των κορυφών που διακρίνονται στο χρωματογράφημα του πρώτου δείγματος είναι εμφανώς μικρότερος από τα άλλα δύο δείγματα. Αντίθετα, η διακριτική ικανότητα του δεύτερου και του τρίτου δείγματος είναι συγκρίσιμη. Αυτό οφείλεται στο ότι για την επεξεργασία του τρίτου δείγματος απαιτείται προσθήκη διπλάσιας ποσότητας διαλυτών παραγώγισης (60μl MeoX και 1200μl MSTFA) σε σχέση με τα άλλα δύο δείγματα (30μl MeoX και 60 μl MSTFA). Έτσι, για λόγους οικονομίας χρόνου και αναλωσίμων, επιλέχθηκε η συλλογή κυττάρων από 2 τρυβλία (με 100% κάλυψη) ανά δείγμα, για τη μέτρηση όλων των μεταβολικών προτύπων των δειγμάτων.

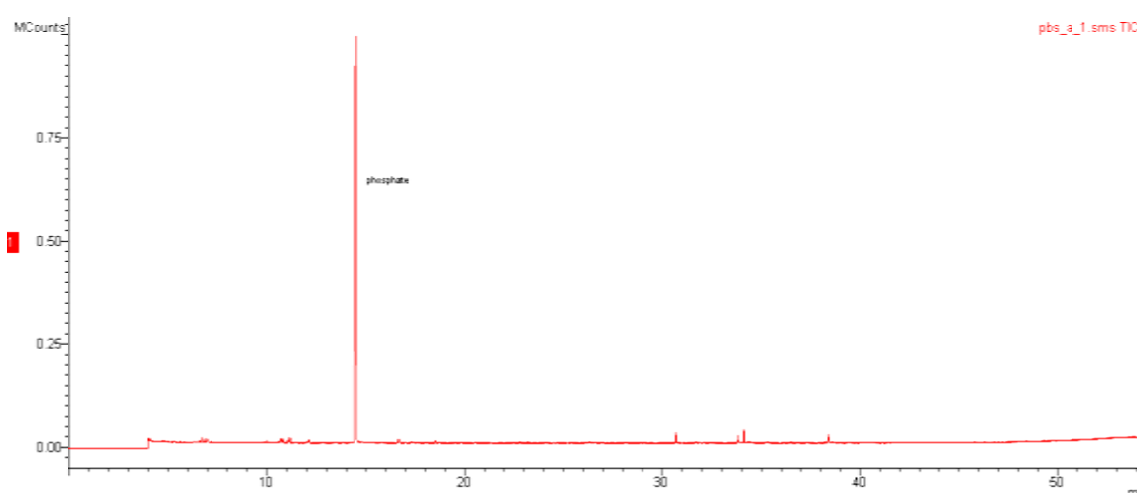
Τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα είναι αρκετά πλούσια με περίπου 400 κορυφές, από τις οποίες εκτιμάται ότι θα αντληθεί πληροφορία για περίπου 80-100 μεταβολίτες, αριθμός ικανός για την ανασύσταση και τη μελέτη μεταβολικών μονοπατιών. Σε όλα τα χρωματογραφήματα παρατηρείται μία πολύ υψηλή κορυφή που αντιστοιχεί στα φωσφορικά ιόντα, της οποίας το ύψος παραμένει σχεδόν σταθερό και στα τρία δείγματα. Αυτή πιθανώς προέρχεται από τη χρήση του διαλύματος PBS κατά τη συλλογή των κυττάρων, μικρή ποσότητα του οποίου παραμένει στο δείγμα που αναλύεται και υπερκαλύπτει τις αντίστοιχες κορυφές των ενδοκυττάρων φωσφορικών ιόντων. Έτσι, για να ελεγχθεί η παραπάνω υπόθεση, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του προτύπου του διαλύματος 1xPBS (10μl, προσομοίωση του PBS που υπάρχει στο δείγμα των κυττάρων). Στο αντίστοιχο χρωματογράφημα (Εικ. 3.4.), εμφανίστηκε η κορυφή των φωσφορικών ιόντων στο ίδιο ύψος με τα προηγούμενα χρωματογραφήματα, στοιχείο που συνηγορεί υπέρ της αρχικής υπόθεσης. Η παραμονή αυτής της κορυφής λόγω του PBS σε όλα τα μελλοντικά πειράματα, θα αποτελούσε σημαντικό περιορισμό της μεθόδου και θα οδηγούσε πιθανώς σε μειωμένη διακριτική ικανότητα, βάσει της υπόθεσης ότι τα



**Εικ. 3.3.:** Συγκριτική παρουσίαση των μεταβολικών προτύπων τριών δειγμάτων με διαφορετική ποσότητα κυττάρων *HeLa* το καθένα. Το πρώτο χρωματογράφημα αντιστοιχεί σε δείγμα που προέρχεται από  $1 \times 10^6$  κύτταρα, το δεύτερο σε  $2 \times 10^6$  κύτταρα και το τρίτο σε  $5 \times 10^6$  κύτταρα. Κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε διαφορετικό μεταβολίτη (αναγράφονται ενδεικτικά ορισμένοι).



φωσφορικά ιόντα είναι μια ομάδα μεταβολιτών, η μέτρηση των οποίων εκτιμάται ότι είναι πληροφοριακή στη συγκεκριμένη μελέτη. Η πρωτεΐνη FRA10AC1 πιθανόν συμμετέχει στο μεταβολισμό του mRNA και, καθώς τα φωσφορικά ιόντα συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος, και σε ενεργειακές κυτταρικές διαδικασίες, αναμένεται ότι η υπερέκφραση ή η καταστολή της στα κύτταρα θα επιδρά στη συγκέντρωση αυτών των μεταβολιτών. Για αυτό το λόγο, συλλέχθηκαν κύτταρα ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας όμως ως διάλυμα πλύσης 1xTBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6). Τα δείγματα αυτά φυλάχθηκαν στους -80<sup>0</sup> C για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση των προτύπων τους και να επιβεβαιωθεί η καταλληλότητα χρήσης του διαλύματος TBS στη συλλογή των δειγμάτων.



**Εικ. 3.4.:** Μεταβολικό πρότυπο του διαλύματος PBS (προσομοίωση του διαλύματος που παραμένει στο δείγμα). Η κορυφή αντιστοιχεί σε φωσφορικά ιόντα.

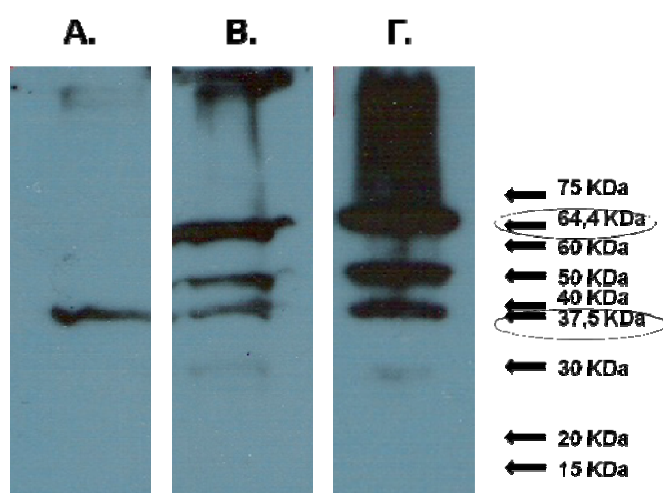
### 3.4. Υπερέκφραση του γονιδίου *FRA10AC1* σε κύτταρα *HeLa*

Για τη μελλοντική διερεύνηση της επίδρασης της υπερέκφρασης του *FRA10AC1* στις κυτταρικές λειτουργίες με μεταβολομική ανάλυση, πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με πλασμιδιακή κατασκευή που περιλάμβανε το πλήρους μήκους cDNA του γονιδίου στο φορέα έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών pEGFP-N1 (Σαραφίδου Θ., Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 2005). Η διαμόλυνση έγινε με τη μέθοδο της συγκατακρήμνισης του DNA με Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> και η απόδοσή της εκτιμήθηκε κατά προσέγγιση σε ποσοστό 10%, με παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε 48h μετά τη διαμόλυνση, χρησιμοποιώντας διάλυμα 1xTBS για τις πλύσεις και πραγματοποιώντας όλους τους χειρισμούς στον πάγο. Σε κάθε δείγμα συλλέχθηκαν περίπου 2x10<sup>6</sup> κύτταρα (σε

πελέττα) από δύο πανομοιότυπα τρυβλία διαμέτρου 10cm. Συλλέχθηκαν επίσης δείγματα ελέγχου με κύτταρα διαμολυσμένα μόνο με το φορέα και μη διαμολυσμένα. Αποθηκεύθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι να σταλούν για μεταβολομική ανάλυση.

Ο έλεγχος της υπερέκφρασης έγινε με ανάλυση Western με το αντίσωμα  $\alpha$ -FRA10AC1 (αραίωση: 1/500), για την οποία χρησιμοποιήθηκε για κάθε δείγμα, το πρωτεϊνικό εκχύλισμα από  $5 \times 10^5$  κύτταρα (1/2 τρυβλίο με 100% κάλυψη). Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν μόνο με το φορέα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western, στα διαμολυσμένα με το φορέα κύτταρα ανιχνεύθηκε μόνο η ενδογενής πρωτεΐνη FRA10AC1 (37, 5 kDa)(Εικ. 3.4.A.), ενώ στα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με την πλασμιδιακή κατασκευή ανιχνεύθηκε επιπλέον και η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη FRA10AC1-EGFP (Εικ.3.4.B.), της οποίας εκτιμώμενο μοριακό βάρος είναι 64,4 kDa, [Exprasy tool (Compute pI/MW), [http://web.exprasy.org/compute\\_pi/](http://web.exprasy.org/compute_pi/)]. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκφράστηκε 2,7 φορές περισσότερο από τα επίπεδα της ενδογενούς πρωτεΐνης, σύμφωνα με την εφαρμογή του υπολογιστικού προγράμματος Gelpro32. Επίσης, εμφανίστηκε μια πρωτεϊνική ζώνη μεγέθους περίπου 50 kDa (Εικ.3.4.B.). Αρχικά, έγινε η υπόθεση ότι η εμφάνιση αυτής της ζώνης οφείλεται στην επεξεργασία του δείγματος πριν την ηλεκτροφόρηση (πιθανόν δεν ήταν επαρκής η θέρμανση του δείγματος) και η διαδικασία επαναλήφθηκε (Εικ. 3.4.Γ.). Ωστόσο, τα αποτελέσματα ήταν ίδια (σύγκριση με εικόνα 3.4.B). Έτσι η εμφάνιση της ζώνης μεγέθους 50 kDa αποδόθηκε στον πιθανό πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.



**Εικόνα 3.4:** Έλεγχος της υπερέκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1* με ανάλυση Western με αντίσωμα  $\alpha$ -FRA10AC1 (αραίωση 1/500) σε δείγμα κυττάρων *HeLa* που διαμολύνθηκαν (A) με το φορέα rEGFP-N1 και με την πλασμιδιακή κατασκευή που παράγει την πλήρους μήκους FRA10AC1 σε σύντηξη με την EGFP στο καρβοξυτελικό άκρο (B και Γ). (Διάρκεια έκθεσης: ~30sec).

Η παροδική διαμόλυνση κυττάρων *HeLa* που εφαρμόστηκε και οδήγησε στην παροδική και σε υψηλά επίπεδα υπερέκφραση του γονιδίου *FRA10AC1*, προσφέρει ένα καλό κυτταρικό μοντέλο για την προκαταρκτική μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης του γονιδίου σε επίπεδο μεταβολικών. Ωστόσο, η σταθερή και μετρίων επιπέδων υπερέκφραση του γονιδίου, η οποία επιτυγχάνεται με τη δημιουργία σταθερά τροποποιημένης κυτταρικής σειράς, προσομοιάζει καλύτερα την κατάσταση της διαταραγμένης ενεργότητας του γονιδίου που μπορεί να συμβεί *in vivo*. Για αυτό το λόγο, προτείνεται μελλοντικά η δημιουργία σταθερά τροποποιημένων σειρών κυττάρων *HeLa* με ενσωματωμένο στο γονιδίωμά τους το πλήρους μήκους cDNA του γονιδίου *FRA10AC1* υπό τον έλεγχο ενός επαγωγίμου υποκινητή. Επιπλέον, στο πλαίσιο της διερεύνησης της τροποποιημένης ενεργότητας του γονιδίου προτείνεται η μελέτη της κατάστασης αποσιώπησης της λειτουργίας του γονιδίου, μετά από παροδική καταστολή της έκφρασής του με siRNA σε κύτταρα *HeLa*. Η μελέτη της μη φυσιολογικής λειτουργίας του γονιδίου, μέσω της ανάλυσης των καταστάσεων υπερέκφρασης και απενεργοποίησης του γονιδίου σε επίπεδο μεταβολώματος, μπορεί να παρέχει σημαντικά δεδομένα για τη διαλεύκανση του βιολογικού ρόλου της πρωτεΐνης *FRA10AC1*. Ωστόσο, τα δεδομένα αυτά δεν είναι αρκετά για την πλήρη κατανόηση της λειτουργίας της πρωτεΐνης. Επειδή το μεταβόλωμα βρίσκεται σε δυναμική αλληλεπίδραση με τα επίπεδα του μεταγραφώματος και του πρωτεϊνώματος, είναι απαραίτητη η ανάλυση των επιπέδων αυτών και η συνδυαστική μελέτη των πληροφοριών που θα προκύψουν από όλα τα πρότυπα (μεταγραφικό, πρωτεϊνικό, μεταβολικό).

## 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του αντισώματος α- FRA10AC1 (συνολική ποσότητα: 186 μg, συγκέντρωση: 310 ng/μl) από πολυκλωνικό ορό κουνελιού (3 ml). Το αντίσωμα θα χρησιμοποιηθεί σε πειράματα ανάλυσης Western για τον έλεγχο της υπερέκφρασης και καταστολής του γονιδίου *FRA10AC1*. Το καθαρισμένο αντίσωμα ελέγχθηκε ως προς την ειδικότητά του και βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες ανάλυσης Western σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων *HeLa*.
- Βελτιστοποιήθηκε η μέθοδος συλλογής των κυττάρων *HeLa* για μεταβολομική ανάλυση με χρωματογραφία αερίων-φασματοσκοπία μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy, GC-MS), ως προς τον απαιτούμενο αριθμό κυττάρων *HeLa* ανά δείγμα (περίπου  $2 \times 10^6$ ) και το χειρισμό του δείγματος (συλλογή, διάλυμα πλύσης). Υπό ανάλυση είναι η λεπτομερής ανάλυση του μεταβολικού προτύπου.
- Πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση σε κύτταρα *HeLa* και υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης FRA10AC1- EGFP σε επίπεδα 2,7 φορές αυξημένα σε σχέση με αυτά της ενδογενούς πρωτεΐνης. Τα διαμολυσμένα κύτταρα συλλέχθηκαν για ανάλυση του μεταβολικού τους προτύπου.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat. Protoc.* 2, 2692–2703.
2. Beecher CWW (2003). The human metabolome. In: George G. Harrigan RG, George G, Harrigan RG, Metabolic profiling: Its role in biomarker discovery and gene function analysis. New York, NY: Springer.
3. Bessonov S, Anokhina M, Will CL, Urlaub H, Lührmann R (2008). Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature* Apr 17;452(7189):846-50.
4. Blom N, Gammeltof S, Brunak S (1999). Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294, 1351–1362.
5. Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell HW, Clarke S, Schofield PM, McKilligin E, Mosedale DE, Grainger DJ (2008). Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using <sup>1</sup>H-NMR based metabonomics. *Nat. Med.* (New York) 1439-1444.
6. Buckingham L, Flaws ML (2007). Molecular Diagnostics, Fundamental methods and clinical applications, F.A. Davis Company, Philadelphia, USA, pp 102.
7. Chrysanthopoulos PK, Goudar CT, Klapa MI (2010). Metabolomics for high-resolution monitoring of the cellular physiological state in cell culture engineering. *Metab Eng.* May;12(3):212-22.
8. Čuperlović-Culf M, Barnett DA, Culf AS and Chute I (2010). Cell culture metabolomics: applications and future directions. *Drug Discovery Today* Volume 15, Numbers 15/16, August 2010.
9. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev.* Jan-Feb;26(1):51-78.
10. Dietmair S, Timmins NE, Gray PP, Nielsen LK, Krömer JO (2010). Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: Development of a metabolite extraction protocol. *Anal Biochem* 404, 155–164.
11. Dixon SJ (2007). Pattern recognition of gas chromatography mass spectrometry of human volatiles in sweat to distinguish the sex of subjects and determine potential discriminatory marker peaks. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* 87 161–72.
12. Dunn WB (2008). Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Phys. Biol.* Feb 20;5(1):011001
13. Dutta B, Kanani H, Quackenbush J, Klapa MI (2009). Time-series integrated "omic" analyses to elucidate short-term stress-induced responses in plant liquid cultures. *Biotechnol Bioeng* Jan 1;102(1):264-79.
14. Farag MA, Ryu CM, Sumner LW and Pare PW (2006). GC–MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry* 67 2262–8.
15. Fiehn O, Kopka J, Dormann P, Altmann T, Trethewey RN & Willmitzer L (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotech.* 18,1157–1161.
16. Fiehn O (2001). Combining genomics, metabolome analysis and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp. Funct. Genomics* 2, 155–168.
17. Fiehn O (2002). Metabolomics- the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol.* Jan;48(1-2):155-71.

18. Fischer HP (2005). Towards quantitative biology: integration of biological information to elucidate disease pathways and to guide drug discovery. *Biotechnol Annu Rev.* 11:1-68.
19. Förster J, Famili I, Fu P, Palsson BØ, Nielsen J (2003). Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Res.* 13, 244–253.
20. Fukusaki E, Kobayashi A (2005). Plant Metabolomics: Potential for Practical Operation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 100, No. 4, 347–354.
21. Gavaghan CL, Holmes E, Lenz E, Wilson ID & Nicholson JK (2000). An NMR-based metabolomic approach to investigate the biochemical consequences of genetic strain differences: application to the C57BL10J and Alpk : ApfCD mouse., *FEBS Lett.* 484, 169–174.
22. Glover TW, Berger C, Coyle J, Echo B (1984). DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum Genet.* 67(2):136-42.
23. Gottschalk M, Ivanova G, Collins DM, Eustace A, O'Connor R, Brougham DF (2008). Metabolomics studies of human lung carcinoma cell lines using in vitro <sup>1</sup>HNMR of whole cells and cellular extracts. *NMR Biomed.* Oct;21(8):809-19.
24. Handt O, Sutherland GR, Richards RI (2000). Fragile sites and minisatellite repeat instability, *Mol. Genet. Metab.* 70, 99–105 Review.
25. Hartmann M, Zimmermann D, Nolte J (2008). Changes of the metabolism of the colon cancer cell line SW-480 under serum-free and serum-reduced growth conditions., *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 44, 458–463.
26. Hewett DR, Handt O, Hobson L, Mangelsdorf M, Eyre HJ, Baker E, Sutherland GR, Schuffenhauer S, Mao JI, Richards RI(1998). FRA10B structure reveals common elements in repeat expansion and chromosomal fragile site genesis. *Mol. Cell.* 1 773–781.
27. Hua Q, Yang C, Baba T, Mori H and Shimizu K (2003). Responses of the central metabolism in *Escherichia coli* to phosphoglucose isomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase knockouts. *J. Bacteriol.* 185:7053–7067.
28. Hollywood K, Brison DR, Goodacre R (2006). Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics Sep*;6(17):4716-23.
29. Jones GL, Sang E, Goddard C, Mortishire-Smith RJ, Sweatman BC, Haselden JN, Davies K, Grace AA, Clarke K, Griffin JL (2005). A functional analysis of mouse models of cardiac disease through metabolic profiling. *J. Biol. Chem.* 280, 7530–7539.
30. Kaddurah-Daouk R, McEvoy J, Baillie RA, Lee D, Yao JK, Doraiswamy PM, Krishnan KR (2007). Metabolomic mapping of atypical antipsychotic effects in schizophrenia. *Mol Psychiatry* .
31. Kaddurah-Daouk R, Kristal BS, Weinshilboum RM (2008). Metabolomics: A Global Biochemical Approach to Drug Response and Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48:653–83.
32. Kanani H, Chrysanthopoulos PK, Klapa MI (2008 ). Standardizing GC-MS metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Aug 15;871(2):191-201.
33. Kim SK, Ro JY, Kemp BL, Lee JS, Kwon TJ, Hong WK, Mao L (1998). Identification of two distinct tumor-suppressor loci on the long arm of chromosome 10 in small cell lung cancer. *Oncogene* 17, 1749– 1753.
34. Lacombe L, Ro JY, Kemp BL, Lee JS, Kwon TJ, Hong WK, Mao L (1996). Microsatellite instability and deletion analysis of chromosome 10 in human prostate cancer. *Int. J. Cancer* 69, 110 – 113.

35. Lindon JC, Keun HC, Ebbels TM, Pearce JM, Holmes E, Nicholson JK (2005). The Consortium for Metabonomic Toxicology (COMET): aims, activities and achievements. *Pharmacogenomics* 6:691–699.
36. Lodge J, Lund P & Minchin S (2007), Gene Cloning, Principles and Applications. Taylor & Francis Group, New York, USA, pp 121.
37. Lorenz MA, Burant CF, Kennedy RT. Reducing Time and Increasing Sensitivity in Sample Preparation for Adherent Mammalian Cell Metabolomics. *Anal Chem.* May 1;83(9):3406-14
38. Lui LH, Vikram A, Abu-Nada Y, Kushalappa AC, Raghavan GSV and Al-Mughrabi K (2005). Volatile metabolic profiling for discrimination of potato tubers inoculated with dry and soft rot pathogens. *Am. J. Potato Res.* 82, 1–8.
39. Lukusa T, Fryns JP (2008). Human chromosome fragility. *Biochim Biophys Acta.* Jan;1779(1):3-16.
40. Maharjan RP, Ferenci T (2003). Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*. *Anal Biochem.* Feb 1;313(1):145-54.
41. Manetti C, Bianchetti C, Bizzarri M, Casciani L, Castro C, D'Ascenzo G, Delfini M, Di Cocco ME, Laganà A, Miccheli A, Motto M, Conti F(2004). NMR-based metabonomic study of transgenic maize. *Phytochemistry* Dec;65(24):3187-98.
42. Mavrou A, Syrrou M, Tsenghi C, Metaxotou C (1991). Autosomal folate sensitive fragile sites in normal and mentally retarded individuals in Greece. *Am. J. Med. Genet.* 38, 437– 439.
43. Mayr M (2008). Metabolomics : Ready for the Prime Time?. *Circ Cardiovasc Genet* 1, 58-65.
44. Meadows AL, Kong B, Berdichevsky M, Roy S, Rosiva R, Blanch HW, Clark DS (2008). Metabolic and morphological differences between rapidly proliferating cancerous and normal breast epithelial cells. *Biotechnol. Prog.* 24, 334–341.
45. Mowry BJ, Ewen KR, Nancarrow DJ, Lennon DP, Nertney DA, Jones HL, O'Brien MS, Thornley CE, Walters MK, Crowe RR, Silverman JM, Endicott J, Sharpe L, Hayward NK, Gladis MM, Foote SJ, Levinson DF (2000). Second stage of a genome scan of schizophrenia: study of five positive regions in an expanded sample. *Am. J. Med. Genet.* 96, 864– 869.
46. Nicholson JK, Lindon, JC & Holmes E (1999). 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29, 1181–1189.
47. Nielsen J and Olsson L (2002). An expanded role for microbial physiology
48. in metabolic engineering and functional genomics: moving towards systems
49. biology. *FEMS Yeast Res.* 2:175–181.
50. Nielsen J (2003). It is all about metabolic fluxes. *J. Bacteriol.* 185,
51. 7031–7035.
52. Nielsen J, Oliver S (2005). The next wave in metabolome analysis. *Trends Biotechnol.* Nov;23(11):544-6.
53. Nordström A & Lewensohn R (2010). Metabolomics: Moving to the Clinic. *J Neuroimmune Pharmacol* 5, 4–17
54. Odunsi K, Wollman RM, Ambrosone CB, Hutson A, McCan, SE, Tammela J, Geisler JP, Miller G, Sellers T, Cliby W, Qian F, Keitz BM., Lele S, Alderfer JL (2005). Detection of epithelial ovarian cancer using <sup>1</sup>H-NMR-based metabonomics., *Intengan, Int. J. Cancer* 113, 782-788.
55. Ohdoi C, Nyhan WL, Kuhara TJ (2003). Chemical diagnosis of Lesch-Nyhan syndrome using gas chromatography-mass spectrometry detection. *Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 792, 123-130.

56. Oliver SG, Winson MK, Kell DB & Baganz F (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* 16, 373–378.
57. Petit P, Fryns JP, H. van den Berghe, Hecht F (1986). Population cytogenetics of autosomal fragile sites. *Clin. Genet.* 29, 96– 100.
58. Primrose SB, Twyman RM & Old RW (2001). Principles of Gene Manipulation. Blackwell Science Ltd. Sixth Edition, Berlin, Germany, pp 16- 17.
59. Quinones MP, Kaddurah-Daouk R (2009). Metabolomics tools for identifying biomarkers for neuropsychiatric diseases. *Neurobiology of Disease.* Aug;35(2):165-76
60. Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh MC, Berden JA, Brindle KM, Kell DB, Rowland JJ, Westerhoff HV, van Dam K, Oliver SG (2001). A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat. Biotechnol.* 19, 45–50.
61. Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome., *Genome Res.* Aug;12(8):1231-45.
62. Sambrook and Russell (2001), Molecular cloning: a laboratory manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 15.2, 16.2 16.52.
63. Sarafidou T, Kahl C, Martinez-Garay I, Mangelsdorf M, Gesk S, Baker E, Kokkinaki M, Talley P, Maltby EL, French L, Harder L, Hinzmann B, Nobile C, Richkind K, Finnis M, Deloukas P, Sutherland GR, Kutsche K, Moschonas NK, Siebert R, Gécz J. (2004). Folate-sensitive fragile site FRA10A is due to an expansion of a CGG repeat in a novel gene, FRA10AC1, encoding a nuclear protein. *Genomics* Jul;84(1):69-81.
64. Simone R (2005). Metabolomics Reviewed: A New “Omics” Platform Technology for Systems Biology and Implications for Natural Products Research. *J. Nat. Prod.* 68, 1813-1820.
65. Styczynski MP, Moxley JF, Tong LV, Walther JL, Jensen KL (2007). Stephanopoulos GN. Systematic identification of conserved metabolites in GC/MS data for metabolomics and biomarker discovery. *Anal Chem* 79: 966–973.
66. Sutherland GR, Jacky PB, Baker E (1984). Heritable fragile sites on human chromosomes. XI. Factors affecting expression of fragile sites at 10q25, 16q22, and 17p12. *Am J Hum Genet.* Jan;36(1):110-22.
67. Sutherland GR (1988). The role of nucleotides in human fragile site expression, *Mutat Res.* Jul-Aug;200(1-2):207-13.
68. Sutherland GR. Rare fragile sites (2003). *Cytogenet Genome Res.* 100(1-4):77-84.
69. Theobald U, Mailinger W, Reuss M, Rizzi M (1993). In vivo analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique. *Anal Biochem.* Oct;214(1):31-7.
70. Viant MR, Bearden DW, Bundy JG, Burton IW, Collette TW, Ekman DR, Ezernieks V, Karakach TK, Lin CY, Rochfort S, de Ropp JS, Teng Q, Tjeerdema RS, Walter JA, Wu H (2009). International NMR-based environmental metabolomics intercomparison exercise. *Environ. Sci. Technol.* 43, 219–225.
71. Watson JD, Witkowski JA, Myers RM, Caudy AA (2007), Ανασυνδυασμένο DNA, 1<sup>η</sup> Ελληνική Έκδοση, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, σελ. 191.
72. Weckwerth W (2003). Metabolomics in systems biology. *Annu Rev Plant Biol* 54:669–689.
73. Zhou Z, Licklider LJ, Gygi SP, Reed R (2002). Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* Sep 12;419(6903):182-5.
74. Zlotorynski E, Rahat A, Skaug J, Ben-Porat N, Ozeri E, Hershberg R, Levi A, Scherer SW, Margalit H, Kerem B (2003). Molecular basis for expression of common and rare fragile sites., *Mol Cell Biol.* Oct;23(20):7143-51.